



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Милена М. Јовановић

**МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ МИГРАЦИЈЕ И ИНВАЗИЈЕ
ИМОРТАЛИЗОВАНИХ И ПРИМАРНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА
КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА
У ТРЕТМАНУ МАТИЧНИМ МЛЕЧОМ И АКТИВНОМ
СУПСТАНЦОМ 10H2DA**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023.



**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE**

Milena M. Jovanović

**MOLECULAR MECHANISMS OF MIGRATION AND INVASION
OF IMORTALIZED AND PRIMARY CELL LINES OF COLORECTAL
CARCINOMA IN TREATMENT WITH ROYAL JELLY AND ACTIVE
SUBSTANCE 10H2DA**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Милена М. Јовановић
Датум и место рођења: 28. 05. 1985. Крагујевац, Србија, СФРЈ
Садашње запослење: Истраживач сарадник на Природно-математичком факултету у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Молекуларни механизми миграције и инвазије имортализованих и примарних ћелијских линија колоректалног карцинома у третману матичним млечом и активном супстанцом 10H2DA
Број страница: 164
Број слика: 20
Број шема: 8
Број графикана: 44
Број табела: 6
Број библиографских података: 272
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научне области (УДК): Биологија, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, (577.2: 591.1)
Ментор: др Драгана С. Шеклић, научни сарадник Института за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 08.07.2020. ННВ Природно-математичког факултета, бр. одлуке 270/XI-2
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: Веће за природно-математичке науке, одлука бр. IV-01-466/8, 15.07.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Др Снежана Марковић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија 2. Др Драгана Шеклић, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија; ментор 3. Др Јелена Ракобрадовић, научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд, научна област: Медицинске науке
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
1. Др Наташа Здравковић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Медицинске науке, ужа научна област: Интерна медицина, гастроентерохепатологија 2. Др Емина Малишић, виши научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију Београд, научна област: Медицинске науке, ужа научна област: Онкологија 3. Др Милош Матић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија 4. Др Марко Живановић, виши научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија 5. Др Андрија Ђирић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Хемија, ужа научна област: Аналитичка хемија
Датум одбране докторске дисертације:

Мојој породици

Захвалница

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за Биологију и Екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, као и у Лабораторији за Биоинжењеринг, Института за Информационе Технологије, Универзитета у Крагујевцу.

Највећу захвалност пре свега дугујем свом ментору др Драгани Шеклић на пренетом знању, бодрењу, несебичној помоћи, великом разумевању, драгоценим саветима, а најпре на указаном пријатељству.

Посебно се захваљујем др Наташи Здравковић на сарадњи, обезбеђивању хуманих узорака ткива, као и на конструктивним саветима.

Велико хвала др Марку Живановићу на сарадњи и и сугестијама током реализације ове докторске дисертације.

Захвалност дугујем члановима комисије др Емини Малишић, др Андрији Ћирићу и др Милошу Матићу на драгоценим предлозима који су допринели унапређењу ове дисертације.

Нарочито бих се захвалила др Ивици Петровићу на пријатној сарадњи и пријатељској помоћи приликом израде ове дисертације.

Желела бих да се захвалим др Снежани Марковић на подршци и разумевању током мог професионалног развоја, као и конструктивним предлозима у току израде ове дисертације.

Такође хвала др Јелени Ракобрадовић и Николи Ракобрадовић на сарадњи и датом узорку матичног млеча.

Пуно хвала драгим колегама Лабораторије за Биоинжењеринг на позитивној атмосфери и несебичној помоћи у мом експерименталном раду.

Огромну захвалност дугујем својој породици: родитељима, сестри Јелени и њеној породици, као и свим пријатељима, без чије безусловне љубави, разумевања и подршке ниједан успех не би био могућ.

Хвала Б.

РЕЗИМЕ

Молекуларни механизми миграције и инвазије имортализованих и примарних ћелијских линија колоректалног карцинома у третману матичним млечом и активном супстанцом 10H2DA

Колоректални карцином се карактерише променама ћелијског фенотипа у процесу епително-мезенхимске транзиције (ЕМТ), и присуством матичних ћелија канцера што чини основу миграторних и инвазивних својстава карцинома. Матични млеч, пчелињи производ, коришћен у исхрани људи, заједно са својом активном супстанцом, незасићеном масном киселином 10H2DA, поседује значајна антитуморска својства.

Циљ ове дисертације је испитивање антимиграторних и антиинвазивних ефеката млеча и 10H2DA на имортализованим ћелијским линијама колоректалног карцинома, SW-480 и HCT-116, као и на примарним ћелијским културама изолованим из ткива почетних и напредних стадијума ове болести.

Детерминисана је концентрација 10H2DA, фенолни профил млеча цитотоксичност, антимиграторни и антиинвазивни потенцијал. Промене у експресији маркера ЕМТ-а и матичности су анализиране на протеинском и генском нивоу. Изоловане примарне ћелијске културе су фенотипски окарактерисане и испитивани су ефекти 10H2DA на модулацију фенотипских профила и степен агресивности примарне ћелијске културе.

Резултати указују на различит тип миграције којима се ћелијске линије користе, а третмани су инхибирали миграцију и инвазију супресијом маркера ЕМТ-а и матичности. Примарне ћелијске културе се карактеришу највећом заступљеношћу епителног и матичног фенотипа, што корелира са стадијумом колоректалног карцинома из ког су изоловане. Одлике ћелијских популација и њихова заступљеност у почетним/напредним стадијумима CRC-а корелирају са карактеристикама и степеном прогресије колоректалног карцинома. Третман 10H2DA смањио је проценат агресивног фенотипа епителних ћелија у почетним/напредним стадијумима колоректалног карцинома.

Пчелињи производи дају обећавајуће резултате на тестираним ћелијским културама колоректалног карцинома.

Кључне речи: матични млеч, незасићена масна киселина 10H2DA, колоректални карцином, миграција, инвазија, матичне ћелије, епително-мезенхимална транзиција, примарна ћелијска култура

ABSTRACT

Molecular mechanisms of migration and invasion of immortalized and primary cell lines of colorectal carcinoma in treatment with royal jelly and active substance 10H2DA

Colorectal cancer is characterized by changes in cell phenotype during the process epithelial-mesenchymal transition (EMT), and the presence of cancer stem cells, which presents the basis of the migratory and invasive properties of cancer. Royal jelly, a bee product used in human nutrition, together with its active substance, the unsaturated fatty acid 10H2DA, possesses significant antitumor properties.

The aim of this dissertation is to examine the antimigratory and anti-invasive effects of royal jelly and 10H2DA on immortalized colorectal cancer cell lines, SW-480 and HCT-116, as well as on primary cell cultures isolated from tissue samples of the early and advanced stages of this disease. The concentration of 10H2DA, the phenolic profile of the jelly, cytotoxicity, antimigratory and antiinvasive potential were determined. Changes in the expression of EMT markers and stemness markers were analyzed at the protein and gene level. Isolated primary cell cultures were phenotypically characterized and the effects of 10H2DA on the modulation of phenotypic profiles and the degree of aggressiveness of the primary cell culture were examined.

The results indicate a different type of migration used by the cell lines, and the treatments inhibited migration and invasion by suppressing EMT and stemness markers. Primary cell cultures are characterized by the highest prevalence of epithelial and stem phenotypes, which correlates with the stage of colorectal cancer from which they were isolated. The characteristics of cell populations and their representation in early/advanced stages of CRC correlate with the characteristics and degree of this disease progression. 10H2DA exhibited stronger antimigratory, antiinvasive and anti-EMT effects, as well as reduced the percentage of aggressive phenotype cells in early/advanced stages of CRC. Bee products exert promising effects on tested colorectal cancer cell cultures.

Key words: royal jelly, unsaturated fatty acid 10H2DA, colorectal cancer, migration, invasion, stem cells, epithelial-mesenchymal transition, primary cell culture.

1. УВОД

1.1. Колоректални карцином – одлике и класификација

Тумор или неоплазма се дефинише као комплексна, вишестепена, микроеволуциона трансформација здравог ткива која се независно умножава. У основи канцерогенезе леже поремећаји бројних молекуларних механизма који се односе на процесе: пролиферације, диференцијације и смрти ћелија. Малигни тип тумора је тумор са стеченом способношћу инвазије у околно ткиво. Карцином подразумева малигни тумор епителног порекла (Živančević-Simonović, 2002; Alberts и сар., 2008). Тумори дебелог црева настају као последица непрекидног механичког или хемијског оштећења ћелија. Епителне ћелије су приморане на убрзано дељење у циљу репарације оштећеног ткива, а услед недостатка времена за проверу грешака у току репликације ДНК, нагомилавају се грешке које воде ка настанку карцинома (Weinberg, 2014).

Једна од основних подела тумора дебелог црева према пореклу епитела из кога потичу као и њиховој инвазивној способности, је на: бенигне туморе жлезданог епитела – аденоме; и малигне туморе жлезданог епитела – аденокарциноме.

Аденоми се сматрају важним прекурсором лезија већине спонтано насталих колоректалних карцинома. Малигном променом аденома, формирају се аденокарциноми (Alberts и сар., 2008), а према степену развоја се разликују аденокарцином *in situ*, интрамукозни аденокарцином и инвазивни аденокарцином. Аденокарцином *in situ* подразумева прву секвенцу у карциногенези, са атипичним карактеристикама жлезданог епитела, али са још увек нетакнутом базалном мембраном. Када се ћелије карцинома пробијају дубље у мишићне слојеве мукозе и нађу се у слоју *lamina propria*, али не залазе у субмукозни слој, говоримо о интрамукозном аденокарциному, док инвазивна форма аденокарцинома пробија субмукозу.

Међу карциномима, колоректални карцином (енгл. *Colorectal cancer* – CRC) представља један од најзначајнијих здравствених проблема широм света (Hossain и сар., 2022). У научној и клиничкој пракси, CRC подразумева канцер који настаје у делу колона и ректалној регији. Малигном трансформацијом нормалног епитела ових делова гастроинтестиналног тракта настају преканцерозне лезије и, евентуално, инвазивни карцином. У случају инвазивне форме CRC-а, деградација базалне мембране се уочава и почиње са испољавањем метастатског потенцијала који омогућава дисеминацију у различите удаљене органе. Органи у којима се најчешће формирају метастатске лезије CRC-а су плућа, јетра и скелетни систем

(Šeklić, 2018; Alzahrani и сар., 2021; Hossain и сар., 2022). Више од 95% детектованих колоректалних карцинома су аденокарциноми, настали малигном трансформацијом ткива које чине крипте колона, тзв. жлездане формације дебелог црева. Међутим у већини ових случајева базална мембрана углавном остаје интактна (Šeklić, 2018).

Колоректални карцином, након детекције код пацијената, подлеже класификацији која је неопходан корак клиничког описа тумора у циљу лакше предикције понашања и напредовања болести, али и процене вероватноће преживљавања пацијента. Применом дијагностичких критеријума се омогућава квалитетније одређивање адекватне стратегије лечења (Telloni, 2017). Традиционално, клиничка пракса подразумева примену једног од два главна система класификације CRC-а, у циљу ближег одређивања стадијума ове болести, а то су класификација по **Дјуку** и **TNM** (енгл. *Tumor-nodes-metastases*, скр. TNM).

Хистолошка класификација применом методе по Дјуку је доста једноставна, а подразумева разликовање три основних категорија тумора:

А - тумори ограничени на зид дебелог црева,

Б - тумори присутни и у околним органима, али без формираних метастаза у регионалним лимфним чворовима, и

Ц - метастазе тумора присутне у регионалним лимфним чворовима (Janković, 2007; Akkoca и сар., 2014).

Међутим, обзиром на озбиљност и комплексност овог малигнитета, у лечењу колоректалног карцинома се свеобухватнија, комплетнија слика о стању и карактеристикама добија применом прецизнијег система класификације TNM, успостављеног од стране Америчког заједничког комитета за канцер (енгл. *American Joint Committee on Cancer* - AJCC) и Заједнице за интернационалну контролу канцера (енгл. *Union for International Cancer Control* - UICC) (Shia и сар., 2012). Према овом систему, тумори се детаљније класификују према анатомској локацији и патолошким карактеристикама, и врши се процена примарног тумора (**T**), захваћености лимфних чворова (**N**) и присуство удаљених метастаза (**M**). Могу се разликовати и јасно дефинисати 4 стадијума CRC-а, означени од I до IV, при чему се пацијенти категоришу у 4 одвојене групе са значајно различитим карактеристикама и вероватноћама преживљавања. Стадијуми од I до III се сматрају излечивим стадијумима, за које се примењују конвенционалне методе, хируршка интервенција, зрачење, хемиотерапија, и употреба хормоналне/биолошке терапије, док се IV стадијум сматра неизлечивим (Telloni, 2017). Такође, овај тип класификације CRC-а подлеже константним унапређењима и сматра се врло пластичним, што је резултовало и успостављањем додатних патохистолошких описа тумора, како примарног, тако и локално унапредовалих инвазивних модалитета и удаљених метастаза (**Табела 1**) (Shia и сар., 2012; Telloni, 2017).

Табела 1. TNM класификација тумора дебелог црева према AJCC (модификовано према: Shia и сар., 2012).

Примарни тумор (Т)	
Tx	Немогућност анализе примарног тумора
T0	Без присуства примарног тумора
Tis	Карцином <i>in situ</i> : интраепителни или присутна инвазија у део lamina propria
T1	Присутна инвазија тумора у субмукозни слој
T2	Присутна инвазија тумора у слој muscularis propria
T3	Присутна инвазија тумора у слој muscularis propria периколоректалног ткива
T4a	Присутна инвазија тумора у висцерални перитонеум
T4b	Тумор директно инвадира или адхерира за друге органе и структуре
Захваћеност регионалних лимфних чворова (N)	
Nx	Немогућност анализе захваћености регионалних лимфних чворова тумором
N0	Без присуства метастаза у регионалним лимфним чворовима
N1	Метастазе детектоване у 1-3 регионална лимфна чвора
N1a	Метастазе детектоване у 1 регионалном лимфном чвору
N1b	Метастазе детектоване у 2-3 регионална лимфна чвора
N1c	Депозити тумора у субсерози, мезентеричном, периколичном, периректалном ткиву, без присутних метастаза у регионалним лимфним чворовима
N2	Метастазе детектоване у 4 или више регионалних лимфних чворова
N2a	Метастазе детектоване у 4-6 регионалних лимфних чворова
N2b	Метастазе детектоване у 4 или више регионалних лимфних чворова
Присуство удаљених метастаза (M)	
M0	Без детектованих удаљених метастаза
M1	Детектоване удаљене метастазе
M1a	Метастазе детектоване у 1 удаљеном органу
M1b	Метастазе детектоване у више удаљених органа или у перитонеуму

1.2. Хетерогеност колоректалног карцинома на ћелијском нивоу

Ткиво канцера не представља хомогену масу, већ напротив, испољава изразиту хетерогеност у смислу ћелијских фенотипова, а резултат је микроеволуционих генетских, транскрипционих, епигенетских и/или фенотипских промена (Dagogo-Jack и Shaw, 2018). Последишно, све ћелије присутне у ткиву канцера се разликују како генотипски, тако и фенотипски.

Колоректални карцином представља хетероцелуларни систем где карциномске ћелије коегзистирају са осталим ћелијама. Утврђено је присуство **епителних** ћелија, **фибробласта**, **имуних**, **ендотелних** ћелија (Khaliq и сар., 2022). Малигном ткиву је придружена и строма, као и васкулатура, а инфилтрирани су и многи други типови ћелија са значајним утицајем на функционисање канцера као целине (Visvader и Lindeman, 2012).

1.2.1 Епителне ћелије и маркери епителних ћелија

У оболелом ткиву колона, **епителне** ћелије као доминантан тип ћелија у оквиру тумора, услед мутација у онкогенима и тумор супресор генима различитим сигналним путевима, бивају измењене. Под утицајем ових мутација долази до повећане секреције различитих фактора раста који активирају ћелије у околини. Епителне ћелије, обзиром да су у непрекидној интеракцији са другим типовима ћелија, регулишу њихов рад преко секреције различитих фактора раста. Ово омогућава одрживост и функцију овако комплексног система (Таре и сар., 2017). Обзиром да је пролиферација у канцеру стимулисана и да епителних ћелија има све више, све је више и сигнала које шаљу у околно ткиво, тако да се цела околина тумора придружује и ради у корист карциномског ткива. У основи епитела стоји ћелијска поларност која је омогућена међућелијским везама. Типови међућелијских веза, почев од апикалне према базалној страни ћелије су: чврсте везе, адхерентне, дезмозоми и пукотинасте везе. За сваку од ових веза карактеристични су одређени протеини, који служе као маркери епитела, а нарушавањем њихове грађе и функције долази до губитка основних одлика епитела, апикално-базалне поларизације и контактне инхибиције. За чврсте везе карактеристичан је маркер *zonula occludens-1* (ZO-1), док је за адхерентне везе карактеристичан Е-кадхерин. Поред ових још велики број протеин маркера могу да се користе за карактеризацију и одређивање стања епителних ћелија у карциному. У овом истраживању епителне карактеристике карциномских ћелија и њихово стање су окарактерисане преко: ZO-1, Е-кадхерин и епителни адхезиони ћелијски молекула (енгл. *Epithelial cell adhesion molecule* - EPCAM).

Zonula occludens-1 (ZO-1)

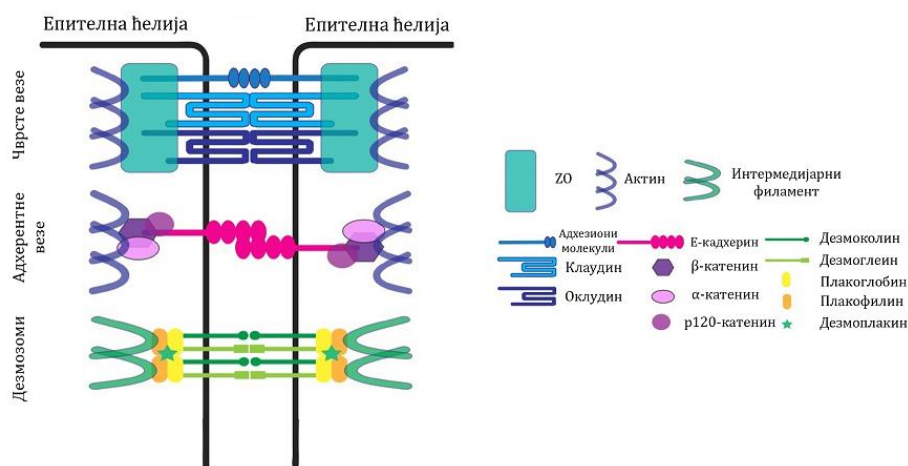
Протеини који улазе у састав међућелијских веза епитела имају кључну улогу у патогенези различитих обољења гастроинтестиналног тракта, укључујући колоректални карцином. Међу такве спада и група протеина под називом *zonula occludens* (ZO), са три најпознатија члана ZO-1, ZO-2, и ZO-3. Ово су цитоплазматски протеини који конектују трансмембранске протеине међућелијских веза, као што су клаудини или оклудини, са актин-цитоскелетним системом унутар ћелије. На овај начин, ZO протеини дориносе ћелијској адхезији. У случају када клаудина или оклудина нема у међућелијским везама, ZO протеини постају везани за кадхерин-катенин комплексе, везујући се за α -катенин. ZO-1 је први идентификован протеин ове групе, величине 220 kD са локализацијом у периферном делу цитоплазме и кључном улогом у одржању интегритета епителних ћелија и одржању међућелијске адхезије (Ке и сар., 2018). Такође учествује и у сигналној трансдукцији везаној за процесе пролиферације, раст, транзицију кроз ћелијски циклус (Раи и Vairappan, 2022). ZO-1 је означен и као тумор супресорски маркер, и мутације или недостатак овог протеина су асоциране са појачаном инвазивношћу

и прогресијом гастроинтестиналних карцинома, укључујући и колоректални (Ke и сар., 2018). Смањена експресија ZO-1 се уочава у ћелијама CRC ткива, док се у метастазама јетре овај протеин детектује као прекомерно експримиран. ZO-1 је критична компонента међућелијских веза са значајном улогом у одржању интегритета интестиналне баријере. Увећана интестинална пермеабилност је у тесној вези са прогресијом CRC-а (Ram и Vairappan, 2022).

Е-кадхерин

Функционисање епителних ткива се ослања на адхезију између ћелија у циљу одржања интегритета ткива, а трансмембрански протеин Е-кадхерин представља главни протеин који посредује у овим адхезивним везама међу суседним епителним ћелијама. Самим тим, ово је један од кључних компоненти епитела и његова смањена регулација је предуслов за транзицију епитела у мезенхим (Moreno и сар., 2021).

Е-кадхерин припада подфамилији кадхерина типа I и лоциран је у зонули адхеренс (Elzagheid и сар., 2006; Christou и сар., 2017). Молекул Е-кадхерина се састоји од цитоплазматског домена, трансмембранског домена кога чини део који само једном пролази кроз ћелијску мембрану и екстрацелуларног домена (Christou и сар., 2017). Е-кадхерини који се налазе на површини две суседне епителне ћелије се међусобно повезују хомофилном трансинтеракцијом. Адхезиона веза између ћелија се успоставља тако што високо конзервисани Н-терминални остаци једног Е-кадхерина формирају тзв. „адхезиону руку” која се убацује у високо конзервисани „акцепторски цеп” кога формирају N-терминални остаци Е-кадхерина на површини друге ћелије (Loх и сар., 2019). Цитоплазматски домен је у интеракцији са молекулима катенина, укључујући β -катенин или плакоглобин (који се такође назива γ -катенин). Катенин посредује у везивању Е-кадхерина за актинске филаменте цитоскелета (**Шема 1**) (Christou и сар., 2017).



Шема 1. Протеини у међућелијским везама
(Извор: Satelli и Li, 2011, модификовано)

Кадхерини играју важну улогу у формацији епителног ткива како ембриона тако и адулта, успостављају веза између ћелија одржавајући хомеостазу ткива адулта (Pećina-Šlaus, 2003; Mendonsa и сар., 2018). Ово значи да губитак експресије Е-кадхерина доводи до губитка контактне инхибиције и резултује повећаном покретљивошћу ћелија и узнатредовалим стадијумима канцера (Mendonsa и сар., 2018).

Смањење регулације Е-кадхерина повезано је са одређеним малигним карактеристикама, укључујући прогресију тумора, губитак диференцијације, инвазију и метастазе (Elzagheid и сар., 2006; Christou и сар., 2017). Е-кадхерин може бити у патолошким условима инактивиран код канцера услед мутација у структури гена, епигенетског утишавања (у виду хиперметилације промотора гена), или због повећане ендокитозе и протеолизе овог протеина. Међутим, установљено је да су мутације Е-кадхерина ретке код карцинома дебелог црева. Абнормалном активацијом различитих протоонкогена може доћи до повећане фосфорилације остатака тирозина у цитоплазматском домену Е-кадхерина, а то доводи до деградације Е-кадхерина. Матрикс металопроотеиназе (енгл. *Matrix metalloproteinase* - MMP), посебно MMP9, такође могу да наруше функцију Е-кадхерина тако што врше хидролизу ектодомена Е-кадхерина близу плазма мембране (Christou и сар., 2017). Најупечатљивија регулација овог протеина у канцеру је дејством транскрипционих супресора, нарочито SNAIL-а, који у повећаним концентрацијама у ћелији врши супресију експресије Е-кадхерина, што је случај и у CRC-у (Christou и сар., 2017; Al Khatib и сар., 2019).

Бројне студије су идентификовале Е-кадхерин као добар биомаркер за прогнозу CRC-а, и метастаза у јетри, јер су губитак експресије Е-кадхерина и инвазивност канцера дебелог црева у тесној вези. Такође је уочено да стимулисање активности Е-кадхерина на површини ћелије инхибира метастатску прогресију, што сугерише да смањење адхезије у овим туморским ћелијама доприноси њиховом метастатском потенцијалу. Као последица ове повезаности, Е-кадхерин и његови супресори су потенцијална мета за лечење канцера (Pećina-Šlaus, 2003; Elzagheid и сар., 2006; Christou и сар., 2017). Овај протеин се због важности назива још и тумор супресор инвазије, и губитак експресије овог протеина је у позитивној корелацији са губитком диференцијације туморског ткива. Познато је да се поновна експресија Е-кадхерина успоставља у ћелијама већ формираних метастаза, заједно са поновном експресијом катенина (Pećina-Šlaus, 2003).

Е-кадхерин није важан само за регулацију међућелијских контаката, већ игра улогу и у регулацији путева трансдукције сигнала. Ову улогу остварује преко актинских филамената преко којих може да регулише пролиферацију ћелија CRC-а, али и матичних ћелија колоректалног канцера путем NANOG-а (Tamura и сар., 2018; Loh и сар., 2019).

Познато је да ниво Е-кадхерина у ћелији може негативно да регулише транскрипциону активност β -катенина, тако што га регрутује из транскрипционог

комплекса са LEF-1/TCF (енгл. *Lymphoid enhancer factor/T-cell factor*) и на тај начин утиче на смањење ћелијске пролиферације и неопластичне трансформације (Stockinger и сар., 2001).

ЕрСАМ

Епителни адхезиони ћелијски молекул (енгл. *Epithelial cell adhesion molecule* - ЕрСАМ) је трансмембрански гликопротеин у нормалним физиолошким условима експримиран на површини здравих епителних ћелија. Његова улога је позната у процесима везаним за ћелијску сигнализацију, миграторним процесима, и у диференцијацији епитела. Појачано је експримиран у CRC-у указујући на високи степен прогресије овог карцинома. ЕрСАМ се испољава као важан маркер у канцерима који настају у епителима, и заједно са Е-кадхерином се користи за детерминацију епителних карциномских ћелија. Нарочито је испољен у брзо пролиферишућим ћелијама са појачаним пролиферативним капацитетом, инвазивним и миграторним потенцијалом, јер интерагује и са актинским цитоскелетом ћелије утичући на њен мотилитет (Langan и сар., 2013). Експресија овог маркера је под регулацијом β -катенина, а његова прекомерна експресија у епителним ћелијама CRC-а води ка смањеној ћелијској адхезији. Овај протеин у току прогресије канцера нарушава интеракције између Е-кадхерина, катенина и актинских филамената, и функционално се повезује са N-кадхерином (Milner и сар., 2014; Boesch и сар., 2018; Gires и сар., 2020). Индикатор је напредног стадијума ЕМТ-а у карциномским ћелијама, и стимулише овај процес стимулацијом појачане експресије његовог регулатора SLUG-а (Boesch и сар., 2018). Познато је да ЕрСАМ има регулаторну улогу у многобројним ћелијским процесима јер утиче на модификацију сигналних путева. Различити сигнали могу довести до дисоцијације његовог интрацелуларног домена који транслоцира из цитоплазме у нуклеус где може формирати комплексе са другим транскрипционим факторима и учествовати активно у регулацији експресије гена (Kalantari и сар., 2022).

1.2.2 Фибробластне (мезенхимске) ћелије и маркери фибробласта

Фибробласти су кључне регулаторне ћелије у ткиву канцера. Блиска просторна интеракција и међузависност фибробласта и епитела, указује да фибробласти имају важну улогу у канцерогенези ткива колона. Фибробласти зависе од Hedgehog сигналног пута епителних ћелија, а заузврат секретују Wnt (енгл. *Wingless-Integrated-1*) лиганде и BMP (енгл. *Bone morphogenetic protein*) антагонисте који одржавају нишу епителних матичних ћелија. Када епителне ћелије подлегну малигним трансформацијама, суседни фибробласти добијају сигнал да интензивно пролиферишу. У овим фибробластима миофибробластни маркер α -SMA (енгл. *Alpha smooth muscle actin*) је прекомерно експримиран.

Фибробласти врше секрецију протеолитичких ензима MMP које деградирају протеине екстрацелуларног матрикса, и на тај начин обезбеђују слободан простор за кретање карциномских ћелија. Повећана бројност фибробласта покреће кретање епителних ћелија, и у том контексту овај тип ћелија представља врло важан маркер лоше прогнозе CRC-а (Tare и сар., 2017).

Секрецијом TGF- β (енгл. *Transforming growth factor beta* - TGF- β) фактора епителне ћелије активирају и трансформишу фибробласте. Овако измењени фибробласти постају тумор придружени фибробласти и имају улогу у контроли и промоцији туморског микроокружења. Ове ћелије реципроцитетно промовишу пролиферацију и миграцију епителних ћелија секрецијом амфирегулина, затим фактора раста HGF (енгл. *Hepatocyte growth factor*) и FGF (енгл. *Fibroblast Growth Factor*), али и помоћу Wnt сигналног пута.

У процесу стицања метастаског потенцијала епителне ћелије губе епителне карактеристике и почињу да експримирају мезенхимске протеине као што су: N-кадхерин, виментин и α -SMA, који се као маркери фибробласта, односно мезенхимског фенотипа, експримирају у агресивним епителним ћелијама.

N-кадхерин

N-кадхерин припада типу-I класичних кадхерина, а зрео N-кадхерин је величине 130 kDa. Као што је и раније описано, кадхерини се везују за β -катенин који се конектује са α -катенином, и преко адаптера винкулина и протеина ZO-1 успостављају везу са актинским филаментима. Разлика између E-кадхерин/ β -катенин и N-кадхерин/ β -катенин комплекса је у томе што је винкулин као адаптерни протеин нешто већи у N-кадхерин/ β -катенин комплексу, што игра улогу у регулацији актинског цитоскелета и међућелијских веза. N-кадхерин је претежно присутан у не-епителним ткивима, као што је ендотел, стромалне ћелије и др. Овај протеин представља маркер епително-мезенхимске транзиције (енгл. *Epithelial-mesenchymal transition* – EMT) у епителним карциномским ћелијама. Његова експресија је у корелацији са напретком болести код различитих типова карцинома. N-кадхерин је заслужан за стимулацију неоангиогенезе одржавајући везе између ендотелних ћелија и стабилишући и одржавајући интегритет крвних судова у овом процесу (Loh и сар., 2019).

N-кадхерин је препознат и као маркер микрометастаза у канцеру и његова експресија постаје прекомерна у ћелијама канцера мезенхимског фенотипа које су покретљивије и мање поларизоване од епителних (Luminturahardjo и сар., 2021).

Током EMT-а у канцеру, губитак E-кадхерина условљава појачану експресију N-кадхерина и ова појава је позната као “кадхерински прекидач” за коју се сматра да је кључни корак у иницијацији EMT-а. У тесној је вези са појачаним миграторним и инвазивним карактеристикама ћелија канцера, као и појачаном стопом пролиферације ћелија канцера (Campbell и Casanova, 2016).

N-кадхерин индукује EMT и појаву карактеристика матичности код карциномских ћелија. Овај протеин у синергистичком дејству са рецептором за фибробластни фактор раста (енгл. *Fibroblast growth factor receptor* - FGFR) може да стимулише експресију MMP-9. Један од путева који промовише EMT је Wnt пут, који утиче на појачану експресију N-кадхерина смањујући E-кадхерин. Смањење E-кадхерина се догађа преко активације Wnt пута, чиме се онемогућава фосфорилација SNAIL протеина од стране GSK3 β (енгл. *Glycogen synthase kinase-3 beta*). SNAIL се акумулира у једру чиме се репримира експресија E-кадхерина што последично доводи до пораста пула N-кадхерина. Регулација Wnt пута од стране кадхерина се остварује преко протеаза са улогом у деструкцији E- или N-кадхерина, чиме се ослобађа β -катенин који активира експресију Wnt таргет гена. Показано је да N-кадхерин може директно да интерагује са LRP5 (енгл. *LDL Receptor Related Protein 5*) ко-рецептором Wnt пута (Loh и сар., 2019).

Виментин

Виментин је мултифункционални протеин из фамилије интермедијарних филамената, величине 57 kDa, најшире експримиран и високо конзервиран протеин из породице интермедијарних филамената типа III (Ivaska, 2011; Satelli и Li, 2011; Du и сар., 2018; Niknami и сар., 2020).

Има способност интеракције са бројним протеинима у ћелији што га чини потенцијалним регулатором неколико различитих физиолошких функција. Одговоран је за одржавање облика ћелије, интегритета цитоплазме, стабилизацију цитоскелетних интеракција, учешће у имуном одговору, процесу зарастања рана и пружа отпорност на стрес (Ivaska, 2011; Satelli и Li, 2011; Du и сар., 2018; Niknami и сар., 2020). Такође регулише и организацију бројних кључних протеина укључених у формирање веза, процесе миграције и ћелијске сигнализације (Vu и Datta, 2017; Du и сар., 2018; Niknami и сар., 2020).

Виментин се експримира још у ембрионалном развићу, а затим и у мезенхимским ћелијама везивног и мишићног ткива, фибробластима, ендотелним ћелијама, макрофагима и многим другим ћелијским типовима (Satelli и Li, 2011; Vu и Datta, 2017; Du и сар., 2018; Niknami и сар., 2020).

Служи као супстрат за бројне киназе и идентификована су вишеструка места фосфорилације на виментину. Фосфорилација виментина игра улогу у регулацији неколико сигналних путева. Виментин, као структурни протеин цитоскелета, очекивано је ограничен на цитосолни део ћелије, међутим, показало се његово присуство и у нуклеусу као и у екстрацелуларном региону. Виментин ступа у интеракцију са интегринима регулишући снагу адхезије ћелија које се везују за супстрат (Satelli и Li, 2011).

Током EMT процеса у канцеру, догађа се његова појачана експресија која се интензивира како канцер напредује, па се сматра значајним маркером EMT-а (Vu и Datta, 2017; Du и сар., 2018; Niknami и сар., 2020). Детектован је у различитим

епителним канцерима. Експресија виментина је углавном карактеристична за метастатски фенотип канцера и представља маркер врло кратког преживљавања пацијената. Експримиран је у карциномима који су инвадирали у регионалне лимфне чворове и извршили интравазацију у крвне судове и циркулацију (Du и сар., 2018; Niknami и сар., 2020).

Виментин се сматра једним од најбољих индикатора ЕМТ-а и одговорним за резистенцију канцера на терапију. Такође је експериментално утврђено да прекомерна експресија виментина стимулише инвазивност и метастатски потенцијал колоректалног канцера, стога је означен као његов важан прогностички маркер. У МЕТ (енгл. *Mesenchymal-epithelial transition*) процесу ћелије почињу да добијају епителни фенотип и показују смањену експресију виментина, а такође се одликују и нижом стопом покретљивости (Satelli и Li, 2011; Du и сар., 2018). Прекомерна експресија овог протеина у CRC-у је под регулацијом многих сигналних путева, међу којима је и Wnt/ β -катенин (Du и сар., 2018). Транскрипциони фактор за који је утврђено да такође регулише експресију виментина је и SNAIL (Vu и Datta, 2017).

Прекомерна експресија виментина код колоректалног карцинома је углавном повезана са стромалном компонентом и ограничена је на стромалне фибробласте, ендотелне ћелије које облажу микросудове и лимфоците који инфилтрирају тумор (Satelli и Li, 2011). Виментин може и да индиректно регулише експресију гена важних у процесу ЕМТ-а (Ivaska, 2011).

α -SMA

У ткиву канцера, малигно трансформисане епителне ћелије активирају фибробласте секрецијом већих концентрација TGF- β фактора у екстрацелуларни простор и последично стимулишу експресију α -SMA протеина у фибробластима. Овај протеин доприноси већој контрактилности фибробласта, омогућава њихово кретање кроз строму и њено механичко и ензимско ремоделовање, што последично олакшава миграцију малигних ћелија. Најинвазивнији тип канцера са високим метастатским потенцијалом акумулира фибробласте са високо експримираним α -SMA протеином и врло често се овај маркер користи за детекцију тумор-придружених фибробласта. Његову експресију је у позитивној корелацији са експресијом транскрипционог фактора SNAIL у CRC-у који га регулише, па губитак или супресија SNAIL-а води ка смањеним нивоима α -SMA у фибробластима (Bhorne и сар., 2022). Такође, експресија Е-кадхерина у епителним карциномским ћелијама је у негативној корелацији са овим маркером, стога повишени нивои α -SMA представљају рани знак ЕМТ-а у канцерогенези CRC-а. Тумор-придружени фибробласти са овим маркером могу да стимулишу пролиферативни капацитет малигних ћелија, али и да утичу и на канцер матичне ћелије. Својим мотилитетом који дугују повећаним нивоима α -SMA актинским филаментима могу чак да мигрирају до метастатских лезија и тамо продру у епителни слој (Valcz и сар., 2012).

Код пацијената са детектованим вишим нивоима α -SMA је забележена значајно већа резистентност на хемиотерапеутике. Такође, он указује на агресивне клиничко-патолошке параметре и врло слабу прогнозу са знатно краћим периодом преживљавања оболелих пацијената (Choi и сар., 2013).

1.2.3 Остали типови ћелија у тумору

Имуне ћелије играју важну улогу у расту, избегавању имуног одговора, у инвазивном потенцијалу и дисеминацији ћелија тумора. Ове ћелије су регрутоване од стране епителних ћелија преко дејства IL-10 (енгл. *Interleukin 10*) и CCL2 (енгл. *Chemokine C-C motif ligand 2*) фактора. Тумор-придружени макрофаги (енгл. *Tumor associated macrophages*) заузврат експримирају сигнални регулаторни мембрански гликопротеин SIRP α (енгл. *Signal regulatory protein α*) који преко CD47 (енгл. *Cluster of Differentiation 47*) сигналног молекула спречава фагоцитозу епителне ћелије и стимулише њену миграцију. Регрутовани макрофаги секретују и IL-6 (енгл. *Interleukin 6*) у циљу активације JAK-STAT (енгл. *Janus kinases signal transducer and activator of transcription proteins*) сигналинга у епителним ћелијама и стимулације пролиферативног и инвазивног потенцијала. Малигно трансформисане епителне ћелије дају сигнал макрофагима за разградњу екстрацелуларног матрикса, процес који је неопходан за инвазију, миграцију и ЕМТ. Такође, тумор придружени фибробласти (енгл. *Tumor associated fibroblasts* – TAF) активирају макрофаге који могу да контролишу продукцију колагена у међућелијски простор. Кооперацијом епитела, фибробласта и макрофага успоставља се регулација имунитета који је окренут у корист малигне ћелије, а туморско ткиво егзистира као посебна целина у оквиру ткива из ког потиче, органа и читавог организма (Brabletz и сар., 2005).

Стицање инвазивног и миграторног потенцијала ћелија канцера је енергетски захтеван процес, и у том смислу зависи првенствено од неоангиогенезе, процеса формирања нових крвних судова унутар ткива канцера. Када ткиво канцера увећа своју масу толико да је потребан доток додатних количина кисеоника и нутријената, карциномске ћелије стимулишу **ендотелне ћелије**, још један тип ћелија која усложњава ткиво тумора. Из постојећих удаљених крвних судова започиње процес неоваскуларизације преко различитих сигналних путева у којима кључну улогу игра путем VEGF (енгл. *Vascular endothelial growth factor*) фактора. Пролиферацијом и међусобним повезивањем, ендотелне ћелије прожимају ткиво канцера обезбеђујући такође и начин за дисеминацију карциномских ћелија путем циркулације кроз читав организам. Без ових тумор инфилтрираних ендотелних ћелија (енгл. *Tumor infiltrated endothelial cells* – TEC) ткиво канцера не би поседовало метастатски потенцијал и остало би у дормантном, мирујућем стању (Hida и сар., 2022; Yao и Zheng, 2023).

Све ово указује на неопходност сагледавања CRC-а као комплексног хетероцелуларног система у коме су различити типова ћелија у врло тесној вези,

блиској комуникацији, и имају ко-регулаторне функције многих процеса (Таре и сар., 2017).

Утицај свих наведених типова ћелија на малигно трансформисане ћелије може бити директан у смислу изазивања метаболичких промена, као резултат формирања хипоксичне средине и флукуације у нутријентима, што такође може да допринесе хетерогености фенотипских популација карцинома. Ћелије једне лозе у оквиру туморске масе се разликују у погледу варијабилности ћелијских процеса, нарочито пролиферативне стопе, интензитета диференцијације, активности апоптотске сигнализације, метаболизма, или нивоа експресије карактеристичних тумор маркера (Singh и сар., 2003; Kreso и Dick, 2014; Kim и сар., 2017). Туморској хетерогености у изразитој мери доприноси и туморска микросредина (енгл. *Tumor microenvironment* - TME) (Kreso и Dick, 2014). Карциномско ткиво има тенденцију да опонаша структуру нормалног, здравог ткива, како по хијерархији, тако и по хетерогености (Kim и сар., 2017).

Епителне ћелије у туморском ткиву се у многоме разликују у степену диференцијације, па се састав туморских субпопулација ћелија драстично мења у зависности од стадијума. У оквиру једне ћелијске лозе разликују се ћелије са високом стопом пролиферације, различитих стадијума диференцијације као и недиференциране **канцер матичне ћелије** (енгл. *Cancer stem cells* - CSC). Субпопулације диференцираних ћелија канцера подлежу убрзаном процесу старења, задобијају секреторни фенотип и могу последично да индукују различите промене у микроокружењу тумора, секрецијом бројних фактора (Walcher и сар., 2020). Субпопулација CSC-а је одговорна за одржавање, преживљавање, резистенцију, као и друге процесе који су важни за регенерацију туморске масе.

На основу свега изнетог, хијерархија карцинома подразумева постојање и коегзистенцију фенотипски хетерогене ћелијске популације у којој диференциране ћелије представљају већину, и концентришу се око субпопулације CSC-а.

1.3. Матичне ћелије

1.3.1 Опште одлике

Матичне ћелије су недиференциране ћелије са карактеристичним својствима **самообнове** и **потентности** по којима се разликују од диференцираних ћелија. Самообнова подразумева капацитет за бројне циклусе ћелијске деобе, али под условом задржавања недиференцираног стања. Матична ћелија одржава способност самообнове механизмом обавезне асиметричне репликације, где се матична ћелија дели на две потомачке ћелије, од којих једна задржава све карактеристике матичности, док друга подлеже процесу диференцијације. Потентност, са друге стране, означава могућност диференцијације ових ћелија у специјализоване ћелијске типове, под утицајем одређених стимулуса који потичу из спољашње средине (Keller, 2005).

Организам човека се у различитим стадијумима развића одликује присуством два типа матичних ћелија, ембрионалних и адултних. Ембрионалне матичне ћелије настају деобом оплођене јајне ћелије и имају способност да створе било које ткиво или орган (тотипотентност). Како напредује умножавање ембрионалних ћелија, али и раст и развој организма, постепеном диференцијацијом губе одлике ембрионалних матичних ћелија. Код адулта се задржавају у различитим ткивима, у великој мери заштићене, и са ограниченом способношћу диференцијације (плури-, мулти-, олиго-, би-, унипотентност). Називају се адултне матичне ћелије, одговорне за стварање ћелија ткива у коме се налазе, са улогом у обнови и регенерацији ткива (Rossi и сар., 2020).

Матичне ћелије се од диференцираних првенствено разликују по фенотипу, јер још увек не експримирају све гене, и стога не поседују фенотип карактеристичан за диференциране ћелије. Такође, одликују се присуством специфичних површинских, цитоплазматских и нуклеарних маркера на основу којих се могу детектовати (Tuch, 2006).

Соматске матичне ћелије поседују специфичне **нуклеарне** маркере, транскрипционе факторе, који регулишу цео матични фенотип, понашање и судбину овог типа ћелија. Најизраженији транскрипциони фактори матичних ћелија су: OCT3/4 (енгл. *Octamer binding transcription factor 3/4*), Sox2 (енгл. *SRY (sex determining region Y)-box 2*), KLF4 (енгл. *Krüppel-like family of transcription factor 4*), NANOG, SALL4 (енгл. *Spalt Like Transcription Factor 4*), LEF1/TCF1, ECAT (енгл. *Embryonic Stem Cell-Associated Transcript genes*), DPPA (енгл. *Developmental Pluripotency-associated Genes*), REX1, и др. (Zhao и сар., 2012; Munro и сар., 2018; Rossi и сар., 2020). У нуклеусу матичних ћелија велики број транскрипционих фактора симултано се везује за један циљани ген у виду комплекса (углавном су то OCT3/4, SOX2, KLF4, NANOG), и такви испољавају своју активност само у матичним ћелијама, док су супримирани у току процеса диференцијације. Са друге стране, они гени за

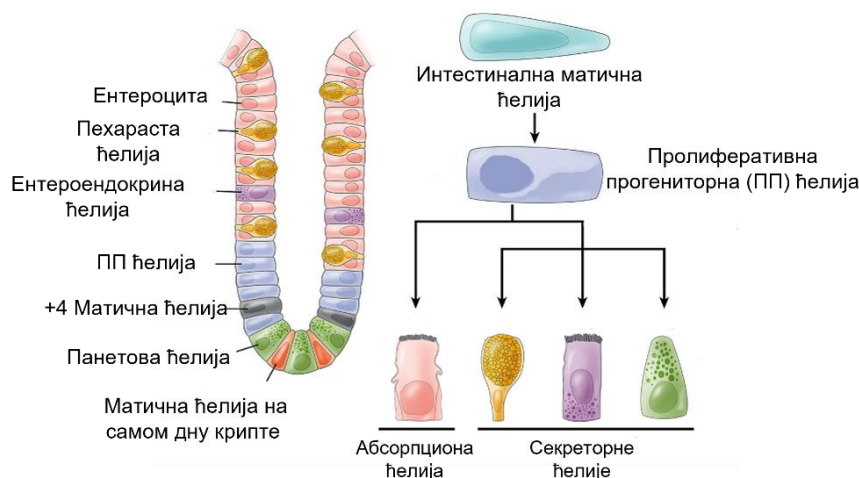
које се везује мали број транскрипционих фактора у појединачном облику су углавном инаktivирани или врло супримирани. Ови нуклеопротеински комплекси, као комбинација различитих транскрипционих фактора, се везују за посебне локусе на ДНК ланцу, и најгушће окупиран локус код матичних ћелија може да има везан за себе 12 или 13 транскрипционих фактора. Ауто-регулација је кључна код ових регулатора матичног стања, јер везивањем за промоторе сопствених гена, регулишу њихову експресију, а и колективно регулишу једни друге повезаном повратном спрегом. Овакво међусобно одржавање адекватних нивоа неопходних фактора утиче на стабилност генске експресије и одржавање плурипотентног стања. Уколико се поремети тај ниво, долази до иреверзибилне диференцијације (Tam и Lim, 2008; Zeineddine и сар., 2014).

Од **цитоплазматских** маркера, присутни су: BMI (енгл. *B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*), Nestin, Musashi-1, хемокин CXCL12 (енгл. *C-X-C motif chemokine ligand 12*), а један од најзначајнијих је и ензим алдехид дехидрогеназа 1 (енгл. *Aldehyde dehydrogenase 1 - ALDH1*) који има улогу у заштити матичних ћелија од оксидативног стреса (Rossi и сар., 2020). Цитоплазматски маркери лоцирани на ћелијској мембрани су, првенствено, CD рецептори (енгл. *Cluster of differentiation - CD*), асоцирани са плурипотентношћу: CD24, CD29, CD44, CD47, CD90, CD133, CD166 (Huang и сар., 2021). Затим, LGR5 (енгл. *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*), SSEA-1, -3, -4 (енгл. *Stage Specific Embryonic Antigen*), TRA-1-60 TRA-1-81, SCF (енгл. *Stem Cell Factor*), ABCG2 (енгл. *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*), Frizzled5, Cripto-1, и др. (Natunen и сар., 2011; Rossi и сар., 2020).

1.3.2 Матичне ћелије канцера - специфичности и улога

С обзиром да мукозни слој дебелог црева чини једнослојни епител који формира инвагинације (крипте) са жлезданом функцијом, и оштећује се у свакодневном контакту са остацима хране, неопходна је његова обнова (Nooteboom и сар., 2010). У једној крипти колона постоји у просеку око 1,5-4,9 хиљада ћелија, а ћелије крипте настају и обнављају од недиференцираних матичних ћелија. Интензивна пролиферација епителних ћелија се догађа управо од стране матичних ћелија смештених у самом дну крипте, које у свом матичном стању остају највише до 72 сата. Ове матичне ћелије се у крипти налазе на позицији +4 од самог дна и деле на сваких 12-16 сати, стварајући око 300 нових ћелија по крипти дневно. Што се више пењу уз крипту навише то се више из недиференцираног (матичног) стања диференцирају, тако да се обнова епитела сматра континуираним кретањем ћелија уз крипту. Ова константна пролиферација ћелија се балансира апоптозом ћелија која се дешава на врху крипти. Међутим, уколико у епителу крипти постоји честа или стална инфламација, може доћи до поремећаја у овим механизмима што води

неконтролисаној пролиферацији и настанку тумора, а у том смислу и колоректалног карцинома (**Шема 2**) (Barker и сар., 2008).



Шема 2. Положај матичних ћелија у односу на друге ћелијске типове у интестиналној крипти колона (Извор: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(11\)00184-3/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(11)00184-3/fulltext), модификовано)

Код колоректалног карцинома, матичне ћелије представљају мању ћелијску популацију, са изразито значајним својствима захваљујући којим карцином опстаје и напредује (Kim и сар., 2017; Frank и сар., 2021). Ова мала субпопулација ћелија првобитно је идентификована код леукемије, да би касније њено присуство било детектовано и у другим типовима солидних облика карцинома (дојке, мозга, панкреаса, дебелог црева и др.).

CSC настају или као последица дедиференцијације у процесу преласка епителне у мезенхимску ћелију током ЕМТ процеса, или као последица малигне трансформације здравих матичних ћелија, под дејством различитих утицаја, као што су: инфекције, токсини, зрачење или присуство других мутагених агенаса.

Током процеса трансформације, онкогени постају прекомерно експримирани, а тумор супресори се инактивирају и тиме долази до стимулације неконтролисаног раста, пролиферације и стварања великог пула мутираних ћелија које се даље диференцирају. Обзиром да матичне ћелије већ поседују неограничен потенцијал, врло је вероватно да је за настанак CSC-а неопходно врло мало геномских промена (Walcher и сар., 2020). Досадашња истраживања показују да се многи маркери експримирају на површини и у унутрашњости здравих матичних ћелија могу наћи и код CSC-а (Zhao и сар., 2012).

У основи негативне реакције канцера на примену одређених стратегија лечења је присуство CSC-а. Иако ова субпопулација ћелија чини само мали проценат укупне масе канцера, због својих критичнијих особина, самообнове и потентности, има изразити капацитет за формирање туморске масе *de novo* (Cabrera и сар., 2015; Pavon и сар., 2014; Singh и сар., 2003; Sreepadmanabh и Toley, 2018; Rossi и сар., 2020). CSC се препознају као иницијатори настанка тумора, стога

и назив тумор-иницирајуће ћелије. Такође су одговорне за раст, напредовање, појаву хетерогености унутар туморске масе, стицање агресивних одлика и резистентности тумора на терапије (Lopez-Lazaro, 2015; Rowehl и сар., 2014; Walcher и сар., 2020). Да би се разумела функција и образац понашања овог типа ћелија у канцеру, неопходно је детаљно окарактерисати природу и порекло CSC-а.

Уобичајене генетске и фенотипске карактеристике које су детектоване, како у здравим матичним ћелијама, тако и у CSC-у, укључују појачано регулисане или дерегулисане сигналне путеве: Notch, Wnt, JAK/STAT, Hedgehog и TGF- β . Ови сигнални путеви имају фундаменталну улогу у развоју, контроли опстанка матичних ћелија и одржавања способности самообнове (Visvader и Lindeman, 2012; Rossi и сар., 2020). Wnt/ β -катенин сигнални пут учествује и доприноси одржавању матичности CSC-а путем метилације и деметилације хистона, а главну улогу имају ензими хистон деметилазе KDM3A, KDM3B, JMJD1C, и хистон метилтрансферазе MLL1, N6, SUV39H1, (Jing и сар., 2021).

Матичне ћелије, како здраве тако и карциномске, одржавају своје уникатне особине самообнове и потентности, односно недиференцираног стања, под јаким контролом која подразумева интензивну епигенетску регулацију експресије маркера матичности. Епигенетска регулација код матичних ћелија је врло стабилна и укључује механизме хиперметилације цитозина у ДНК, модификације хистона (ацетилација и метилација), и пре- и посттранскрипционе регулације на нивоу малих некодирајућих РНК молекула. Експресија гена који су карактеристични за терминално диференцирана стања ћелија морају бити јако супримирани неким од наведених механизма како би матична ћелија остала у недиференцираном стању. Епигенетска регулација је, пак, реверзибилан процес и врло динамично регулисан под утицајем стимулуса који воде порекло из екстрацелуларног микроокружења. То су углавном цитокини/хемокини секретовани од стране тумор-придружених ћелија: фибробласта, ендотелних ћелија и/или ћелија имуног система. У механизму утишавања гена специфичних за процес диференцијације, врло изражену улогу има транскрипциони „комплекс плурипотентности“ кога чине већ поменути фактори OCT4-NANOG-SOX2 (Wu и Sun, 2006). Овај модел контроле експресије гена је карактеристичан и за CSC (Jing и сар., 2021).

Такође, CSC могу и да користе ове сигнале у циљу дисеминације, односно покретања метастатских промена и процеса (Rossi и сар., 2020).

Водећи се најновијим сазнањима из области онколошких истраживања, јасно је да се CSC у многим преклиничким и клиничким студијама детектују првенствено на основу површинских протеина CD-ова, и наравно, у различитим типовима канцера преко врло карактеристичног обрасца експресије многих других унутарћелијских маркера, зависно од типа ткива у коме настају (Rossi и сар., 2020). CD24, CD44 и CD133 су препознати као важни прогностички маркери, нарочито обзиром да су уочени као прекомерно експримирани у CSC ћелијама

колоректалног карцинома. Указују на врло вероватан слаб одговор на терапију, и у тесној су вези са протеинима учесницима Wnt/ β -catenin сигналног пута (Huang и сар., 2021). Неки од наведених CD-ова имају улогу у ћелијској адхезији, неки су хијалуронски рецептори, и у вези су и са другим активним сигналним путевима у матичним ћелијама и главним ћелијским процесима, пролиферацијом, међућелијском комуникацијом, миграцијом и др. (Huang и сар., 2021). На површини матичних ћелија колоректалног карцинома се врло често налазе EpCAM и LGR5, истакнути маркери CSC-а интестиналног тракта (Takahashi и Shiraishi, 2020; Walcher и сар., 2020).

miPHK (енгл. *microRNA*) учествују у регулацији матичног стања CSC-а, а припадају породици малих дволанчаних некодирајућих РНК молекула дужине од око 21–25 нуклеотида. Имају улогу у деградацији или информационе РНК (иРНК) и/или инхибицији транслације иРНК. Прекомерна експресија неких од ових регулаторних молекула је у тесној вези са експресијом маркера CSC-а, нпр.: ALDH1, CD24, CD44, EpCAM, LGR5, SOX2, NANOG, И OCT-4, сигналним путевима CSC-а TGF- β , Wnt, JAK/STAT3, али и анти-апоптотским маркерима CSC-а, BCL-XL и BCL-2 (Hwang и сар., 2021).

Метаболизам CSC-а је, као додатак свему наведеном, измењен и заснива се на примени нешто другачије стратегије за произвођење АТФ-а (енгл. *Adenosine triphosphate*). Диференциране ћелије тумора у циљу производње енергије, односно АТФ молекула, упражњавају гликолизу као главни метаболички процес, чак и у аеробним условима, што је познато као Warburg ефекат. За разлику од њих, CSC се користе и гликолизом, али и оксидативном фосфорилацијом. Прелазак са једног метаболичког процеса на други у многоставно зависи од микроокружења, обзиром да су CSC локализоване у сржи тумора, и врло често снабдевање кисеоником и нутријентима постаје оскудно. Овај прелазак омогућава претходно поменути транскрипциони фактор NANOG (Yasuda и сар., 2021). У случају када CSC користе оксидативну фосфорилацију уместо гликолизе, омогућава се стварање већих количина АТФ-а које су им потребне за стварање резистентности на притиске микроокружења, као што је недостатак нутријената. CSC се одликују и прекомерном експресијом гликолитичких гена, као што је *GLUT1*. Познато је да многи гликолитички ензими испољавају и врло важан утицај на регулацију способности самообнове CSC-а. У складу са тим, детектована је појачана експресија ензима LDH-а (енгл. *Lactate dehydrogenase* - LDH) која стимулише експресију SOX2, NANOG и OCT4 фактора матичности. GLUT1 транспортер глукозе има кључну улогу у одржавању матичних карактеристика у овим ћелијама, нарочито пошто је познато да смањење уноса глукозе у CSC резултује смањењем експресије маркера матичности, нпр. SOX2, NANOG, BMI1 и др. (Alvina и сар., 2021).

Оксидативна фосфорилација има за резултат стварање већих концентрација реактивних врста које CSC ефикасно користе као активне медијаторе у процесу пролиферације. Такође, CSC имају релативно ниске нивое реактивних кисеоничних

и азотних врста што им омогућава бољи опстанак и одржавање матичног стања. Маркер CSC-а, CD44, има важну улогу у контроли интрацелуларних нивоа глутатиона и антиоксидативне заштите ових ћелија (Yasuda и сар., 2021). Још један од механизма којима се CSC служе да би избегле апоптозу узроковану појачаним нивоима ROS-а, који такође могу бити индуковани апликовањем хемио- или радијационе терапије, је појачана експресија анти-апоптотског маркера BCL-2 (Alvina и сар., 2021).

CSC су почетком 21. века постале предмет интензивног истраживања на пољу канцера из разлога што је познато да конвенционални терапеутски приступи имају ефекта само на осетљивије диференциране ћелије, док CSC не реагују (Visvader и Lindeman, 2012; Sreepadmanabh и Toley, 2018). Оне су претежно у стању мировања, или у врло спором транзиту кроз ћелијски циклус, и поседују неколико механизма који доприносе појачаној резистентности на терапије, као што је успешан ефлуks (избацивање) хемиотерапеутика, деактивиран механизам апоптозе и врло ефикасна репарација оштећеног молекула ДНК (Visvader и Lindeman, 2012; Sreepadmanabh и Toley, 2018; Hwang и сар., 2021). Преживљавање је нарочито успешно захваљујући веома високој експресији ABC транспортера (енгл. *ATP binding cassette* - ABC) којима ефикасно избацују ксенобиотику из ћелије, а одликују се и резистенцијом на апоптозу и ефикасним механизмима репарације ДНК (Wang и сар., 2012; Kreso и Dick, 2014; Begicevic и Falasca, 2017). Појачану резистентност на ефекте ксенобиотика дугују и ензиму ALDH (Kim и сар., 2017; Toledo-Guzmán и сар., 2019). CSC поседују и уникатна имунолошка својства која их чине високо резистентним на имунонадзор (Sreepadmanabh и Toley, 2018). Пошто је познато да здраве матичне ћелије имају способност миграције у оквиру оштећеног ткива у циљу успешне регенерације, сматра се да је та способност миграције трансформисана у инвазивни и метастатски потенцијал CSC-а (Kim и сар., 2017).

На основу ових базичних разлика у фенотиповима и панела експримираних маркера, могу се креирати специфичне циљане терапије које би допринеле елиминацији CSC субпопулације канцера.

Додатно свим карактеристикама које су задржале од здравих матичних ћелија, али и стекле услед малигних трансформација, CSC су заштићене и локализовањем у специјалним нишама, дубоко у сржи туморског ткива, где се одржава регулација њихових биолошких својстава (Lopez-Lazaro, 2015). За разлику од CSC-а, остатак тумора се састоји од фенотипски различитих ћелија са ограниченом способношћу пролиферације и туморигеничним потенцијалом (Rowehl и сар., 2014; Cabrera и сар., 2015).

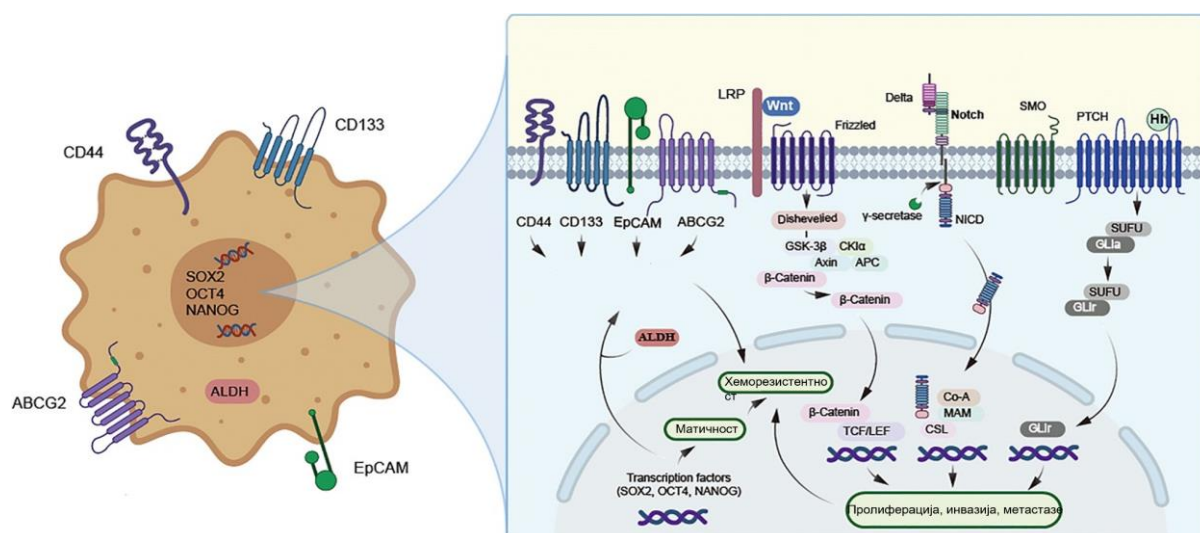
1.3.3 Тумор маркери матичних ћелија канцера

Молекуларни маркер или биомаркер је молекул који се може детектовати у ткиву или серуму, и који омогућава да се идентификује одређено стање и болест. Тумор маркери су супстанце које продукује тумор, или друге ћелије у телу као одговор на тумор. Ови маркери се примењују у детекцији група пацијената са ризиком за развој тумора. Детекција биомаркера омогућава рано откриће високоризичних пацијената у популацији (Banković и сар., 2010). Тумор маркери CRC-а се користе у оцени одговора на третман или приликом праћења пацијента након третмана.

Присуство ових маркера је у асоцијацији са одржањем стања матичних ћелија како у *in vitro*, тако и у *in vivo* системима, и ћелије које су позитивне на ове маркере су показале да успешно генеришу туморе (Langan и сар., 2013).

Смањење нивоа тумор маркера може да укаже на позитиван одговор на неки третман. Молекуларни маркери могу се пратити на молекулској и генској основи, и укључени су у процесе везане за настанак и развој канцера (Nikolouzakis и сар., 2018). Биомаркери могу бити класификовани на: генетичке, епигенетске, протеинске, метаболичке и имунолошке биомаркере (Kurpusamu и сар., 2017).

Матичне ћелије канцера су до сада идентификоване помоћу многобројних маркера од којих регулаторну функцију имају транскрипциони фактори: SOX2, KLF4, и OCT3/4 и NANOG, који регулишу експресију осталих ефекторних маркера, као што су: EpCAM, ABCG2, ALDH1B1, CD44, CD133, LGR5 (**Шема 3**) (Khalek и сар., 2010; Langan и сар., 2013).



Шема 3. Маркери матичних ћелија канцера
(Извор: <https://www.frontiersin.org/>, модификовано)

1.3.3.1 ALDH1B1

Алдехид дехидрогеназе представљају групу ензима са значајном улогом у великом броју биолошких процеса, међу којима је детоксификација алдехида егзогено или ендогено насталих у организму (Marchitti и сар., 2008). Каталишу иреверзибилну оксидацију различитих алифатичних и ароматичних алдехида до ретиноинске киселине, која је дериват витамина А са улогом у активацији различитих сигналних путева у ћелији везаних за одржавање матичности, са једне стране, и пролиферацију са друге (Singh и сар., 2015). Показано је да је прекомерна експресија ове групе ензима у вези са иницијацијом, прогресијом канцера и његовом резистенцијом на терапију. Алдехид дехидрогеназе позитивно делују на пролиферацију и негативно на апоптозу у ћелијама хуманог колоректалног карцинома (Singh и сар., 2015). Експресија ALDH1B1 (алдехид дехидрогеназе 1 B1) ензима је потврђена у здравом ткиву колона, и његово присуство је ограничено само на дно интестиналне крипте, у делу где су лоциране матичне ћелије. Међутим, у ткиву колоректалног карцинома постоји драстични пораст нивоа експресије овог ензима (Golla и сар., 2020).

Интензивна експресија и висока активност ALDH1B1, једног од значајних чланова ове групе ензима, је детектована у матичним ћелијама канцера, нарочито колоректалног карцинома, а абнормално висока експресија ALDH1B1 се уочава у примарним хуманим колоректалним аденокарциномима. Уочена је и блиска веза између активiranог Wnt/ β -катенин сигналног пута и повећане експресије овог ензима, указујући на значајну улогу ALDH1B1 у развоју канцера путем модификације овог сигналног пута (Singh и сар., 2015). Утишавање експресије ALDH1B1 маркера је довело до закључка да се раст колоректалног карцинома значајно смањује у *in vivo* модел систему, указујући на важност ALDH1B1 протеина у напредовању овог малигнитета (Golla и сар., 2020).

1.3.3.2 NANOG

С обзиром да у функционисању матичних ћелија канцера учествују и транскрипциони фактори чије се дејство испољава у једру на ДНК молекулу, важно је поменути NANOG, који је првенствено био откривен код хуманих ембрионалних матичних ћелија. Његова улога се огледа у регулацији самообнове и плурипотентности матичних ћелија активирајући репресоре диференцијације и супримирајући активаторе диференцијације. Ово значи да смањена активност NANOG-а индукује диференцијацију, док прекомерна експресија NANOG-а индукује плурипотентност ћелија (Ambady и сар., 2010). Досадашња испитивања су потврдила присуство овог маркера у ембрионалним матичним ћелијама, герминативним ћелијама, хуманим карциномима, као и у адултним хуманим фибробластима. Међутим, његова експресија је највећа у ембрионалним матичним ћелијама и карциномским ћелијама (Ambady и сар., 2010; Khosravi и сар., 2021).

Повећани нивои експресије овог маркера су детектовани у матичним ћелијама различитих типова канцера. Уочено је да ниво његове експресије корелира са способношћу самообнове, поновним појављивањем канцера, као и слабом стопом преживљавања пацијената. Има значајну улогу у клиничком предвиђању стања, рецидива и резистентности колоректалног канцера, као и преживљавању пацијената (Wahab и сар., 2017). Појачана експресија NANOG-а је детектована у ћелијама канцера колона у скоро свим испитиваним узорцима, и у корелацији је са лошом прогнозом пацијената оболелих од колоректалног карцинома. NANOG се сматра одговорним фактором у прогресији канцера, јер утиче на пролиферацију, ЕМТ програм, инвазивност и миграцију ћелија канцера, игра виталну улогу у метастазирању и стимулише резистенцију на конвенционалне хемиотерапије (Amini и сар., 2014; Khosravi и сар., 2021). Активацијом NANOG-а индукује се ЕМТ посредством стимулације појачане експресије SLUG и SNAIL транскрипционих фактора. Његова експресија је такође и у вези и са анти-апоптотским протеином BCL-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*), али и TGF- β и Wnt/ β -катенин сигналним путевима (Ibrahim и сар., 2012; Szarynska и сар., 2017). Показано је да супресија NANOG-а у ћелијама канцера колона у 100% узорака знатно утиче на инхибицију ћелијске миграције и појачава осетљивост ћелија колоректалног канцера на апликовани стандардни цитостатик 5-флуороурацил (Khosravi и сар., 2021).

1.3.3.3 ОСТ3/4

Један од доминантних маркера карциномских матичних ћелија је ОСТ3/4 (енгл. *Octamer-binding transcription factor 3/4*), скоро искључиво експримиран у матичним ћелијама, и користи се као маркер недиференцираног стања (Ben-Shushan и сар., 1998). ОСТ3/4 учествује у контроли ћелијског циклуса, репримирању апоптотских путева, и репарацији ДНК молекула (Dai и сар., 2013; Munro и сар., 2018). Маркер је матичних ћелија колоректалног канцера и познато је да је његова експресија појачана у карциномским ткивима, за разлику од нормалног, здравог ткива, и нивои експресије су у корелацији са стадијумом ове болести. Присуство и прекомерна експресија ОСТ3/4 фактора указује на поновно враћање CRC-а након хемио-радијационе терапије (Dai и сар., 2013). Овај биомаркер стимулише канцерогенезу, миграцију, инвазивност, појаву метастаза, а значајну улогу има у регулацији ЕМТ процеса (Dai и сар., 2013; Munro и сар., 2018). Наиме, његова супресија води изменама у Е-кадхерин и виментин експресији, као и смањеној способности регулације експресије гена од стране β -катенин/TCF/LEF комплекса (Dai и сар., 2013).

1.3.3.4 KLF4

KLF4 је транскрипциони фактор неопходан за самообнову и плурипотентност CSC-а у којима је прекомерно експримиран (Zeineddine и сар., 2014). Има улогу регулације ћелијског циклуса и апоптотских процеса, стимулације пролиферативних, миграторних и инвазивних способности CSC-а, а самим тим и метастатског потенцијала. Такође, ЕМТ процес у овим ћелијама је под јаком контролом KLF4 фактора, па уколико дође до његове супресије све ове карактеристике су инхибиране. У том случају се такође смањује и способност иницијације тумора од стране CSC-а, резистентност канцера на хемиотерапеутике и експресија маркера матичности (Munro и сар., 2018). Подаци о нивоу његове експресије су опречни и недовољно разјашњени, па се са једне стране наводи да прекомерна експресија KLF4 смањује туморигеничност и инхибира пролиферацију ћелија, преко интеракције KLF4 и β -катенин/TCF комплекса чиме се спречава деловање овог комплекса (Ma и сар., 2017). Према другим наводима, прекомерно експримиран KLF4 фактор стимулише мезенхимске одлике и матичност у CRC-у. Уколико се експресија овог фактора спречи, уочава се одсуство N-кадхерина, виментина, и SLUG-а, а долази до повећања нивоа ZO-1 и E-кадхерина. Овакве промене у мезенхимским и епителним маркерима су последице онкогене функције KLF4 фактора преко TGF- β 1/SNAIL сигналног пута (Leng и сар., 2020).

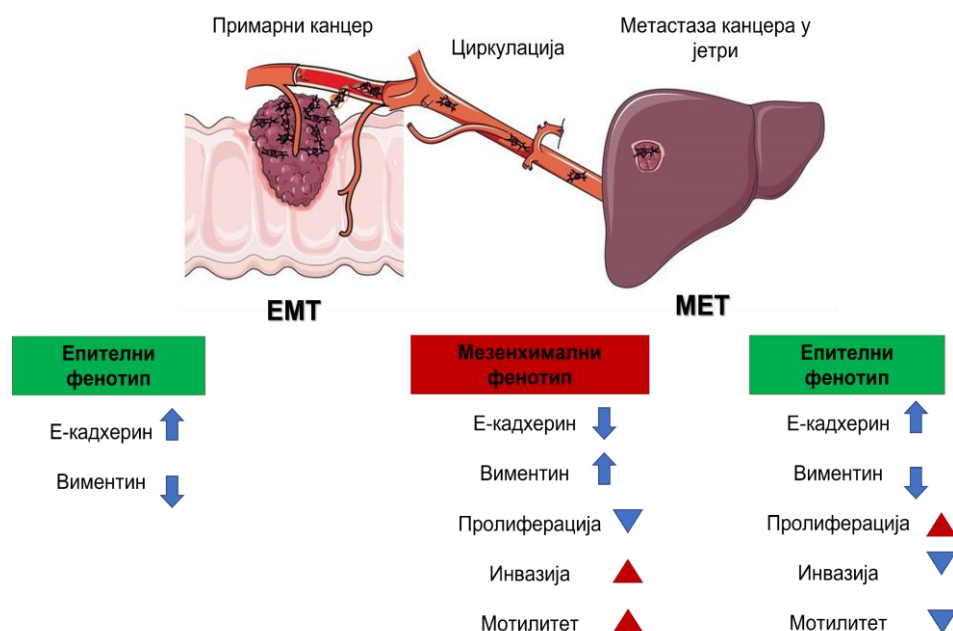
1.4. Механизам епително-мезенхимске транзиције

Настанак и прогресија канцера подразумева вишеструке измене главних процеса укључених у ћелијску и ткивну хомеостазу. Притом, ћелије канцера стичу нова абнормална својства узрокована променама у структури гена, начином на који се гени транскрибују и преводе, затим промене на нивоу транскриптома, функције протеина, итд. Све наведено прогресивно доводи до развића малигног фенотипа. У циљу превазилажења баријера на путу ка њиховом ширењу, потребно је да трансформисане ћелије стекну додатне способности. Истраживања канцера се у великој мери фокусирају на проучавање процеса ЕМТ-а, као критичног механизма потребног за стицање миграторног и инвазивног потенцијала карциномских ћелија који може кулминирати формирањем метастаза (Гресо и сар., 2021). Овај механизам подразумева трансформацију епителних ћелија у мезенхималне стицањем јединствених карактеристика које им омогућавају да у току напретка канцера оне продру (инвадирају) у околно ткиво пре него започну процес метастазирања у удаљеније органе (Pavlič и сар., 2021; Shan и сар., 2021). ЕМТ процес се описује као механизам тзв. трансдиференцијације приликом чега долази до губитка међућелијских веза и поларности, реорганизације цитоскелета, репрограмирања сигналних путева и генске експресије, а све у циљу формирања ћелија мезенхималног фенотипа, са високом способношћу покретљивости и деструкције базалне мембране. Овакве ћелије деградирају екстрацелуларни

матрикс секрецијом ензима MMP-а (Šeklić, 2018). EMT је у тесној вези са активирањем анти-апоптотских сигналних путева, иницијацијом, инвазијом, метастазирањем канцера, и има значајну улогу у стицању резистенције на антиканцерске терапије (Wong и сар., 2014; Dai и сар., 2021; Shan и сар., 2021; Ni и сар., 2022).

Сматра се да се процес EMT јавља у ћелијама које се налазе на граници туморске масе и ткива које га окружује, на подручју инвазивног фронта, док су ћелије у самом тумору поштеђене овог процеса и задржавају епителне карактеристике (Šeklić, 2018). Такође је показано и да се ћелије које су подлегле EMT процесу одликују заустављеном ћелијском пролиферацијом, понашају слично матичним ћелијама изолованим из нормалних или неопластичних ћелијских популација, могу да регулишу микроокружење, и резистентне су на имуни одговор (Cabrera и сар., 2015; Šeklić, 2018).

Карциномске ћелије које су подлегле EMT-у и стекле мезенхимални фенотип губе епителне одлике и маркере са главном функцијом у међусобном повезивању ћелија, као што су Е-кадхерин, различити типови катенина, оклудини, клаудини, дезмоплакани, плакоглобини. Са друге стране, ове ћелије стичу нове мезенхималне карактеристике и маркере од којих су најизраженији: N-кадхерин, виментин, цитоплазматски β -катенин, SNAIL, као и многи други (**Шема 4**) (Šeklić, 2018).



Шема 4. Шематски приказ EMT и MET процеса у колоректалном карциному
(Извор: <https://gut.bmj.com/content/62/9/1315>, модификовано)

Супротно процесу EMT, дешава се и процес преласка из мезенхималног у епителни фенотип, односно враћање у првобитни фенотип ћелије. Овај процес је

кључан у формирању секундарних тумора и карактеристичан је у каснијим фазама метастазирања (Ћао и сар., 2011; Вакіг и сар., 2020). Како је за ЕМТ кључан корак за супримирање експресије Е-кадхерина, тако је за МЕТ карактеристична поновна експресија овог маркера (Ћао и сар., 2011).

Чињеница је да постоје и прелазни типови између епителних и мезенхимских фенотипова, односно карциномске ћелије могу подлећи делимичном ЕМТ-у. У овом случају оне испољавају хибридни епително/мезенхимски фенотип за који се сматра опаснијим и резистентнијим на третмане, у поређењу са ћелијама које имају предоминантни епителни или мезенхимски фенотип (Loh и сар., 2019).

ЕМТ је динамичан процес инициран стимулусима из микросредине ћелија, као што је екстрацелуларни матрикс (колаген, хијалуронска киселина), али и многим секретованим солубилним факторима раста (нпр. EGF, FGF, BMP, TGF β , TNF- α) и цитокинима (Wang и сар., 2013).

ЕМТ, и опречни процес МЕТ, играју важну улогу током ембрионалног развића, али и током канцерогенезе и метастатске прогресије. ЕМТ је важан регулатор пластичности карциномских ћелија, и у тесној је вези са стањем матичности, омогућавајући мултипотентност. Базирајући се на најновијим научним сазнањима, ЕМТ омогућава карциномским ћелијама одлике матичности, односно стицање мезенхимских карактеристика, са високом стопом инвазивности, мотилитета и капацитетом самообнове. Такође, ЕМТ који је индукован фактором SNAIL стимулише особине матичног стања у различитим карциномима. У томе помажу и транскрипциони фактори ZEB1 и TWIST1, али и сигнални путеви Notch, TGF- β , и Wnt/ β -катенин, за које се зна да су међусобно повезани и кооперативно регулишу ЕМТ процес који је у вези са стицањем и одржавањем стања матичности у CSC-у (Rossi и сар., 2020).

1.4.1 Маркери епително-мезенхимске транзиције

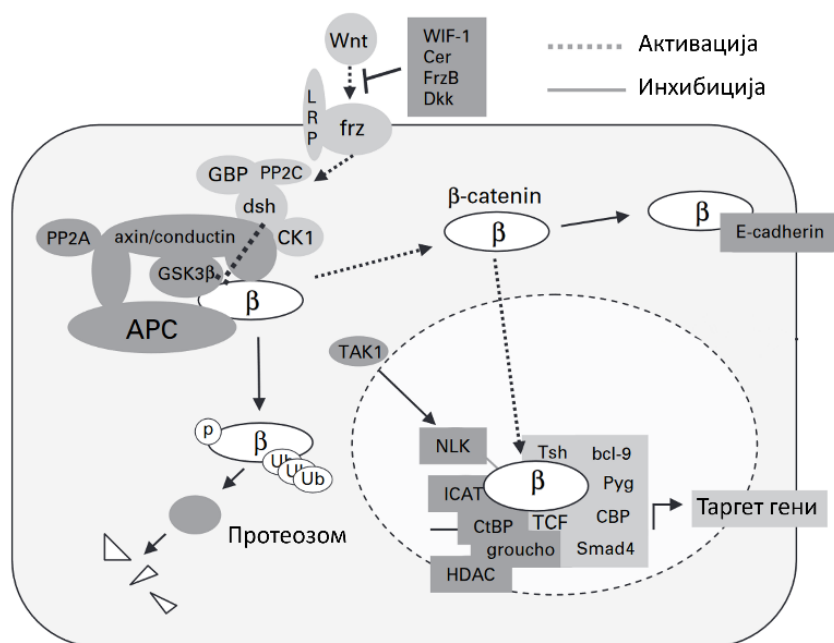
ЕМТ процес је регулисан транскрипционим факторима који делују појединачно, али најчешће удружено, а формирањем различитих комбинација фактора на промоторима таргет гена утичу на супресију епителних, а стимулацију мезенхимских, али и маркера матичности у канцеру. Стога је познавање регулатора ЕМТ-а од кључне важности.

1.4.1.1 Регулаторни маркери ЕМТ-а

β -катенин

Овај протеин има двојаку функцију у регулацији ЕМТ процеса обзиром да је кључни транскрипциони фактор Wnt сигналног пута, са истакнутом улогом у промоцији ЕМТ-а (Vu и Datta, 2017). У случају здравих ћелија, када нема улогу у повезивању Е-кадхерина на ћелијској мембрани са актинским цитоскелетом у

цитоплазми ћелије, и када Wnt није активан, β -катенин у цитоплазми бива константно фосфорилисан комплексом GSK3 β /CK I/Axin/APC, па бива деградиран. Међутим, уколико се Wnt пут активира, деградација β -катенина се блокира, акумулира се у цитоплазми, и транслоцира у нуклеус где преноси сигнал у виду регулације експресије гена (Шема 5). Акумулација β -катенина у нуклеусу ћелија се може десити и услед мутација у компонентама деградационог система (нпр. APC-a) (Conacci-Sorrell и сар., 2003).



Шема 5. Интрацелуларна локализација и функција β -катенина у ћелији
(Извор: Brabletz и сар., 2005, модификовано)

Удружен са нуклеарним комплексом TCF/LEF1 регулише експресију циљаних гена, међу којима су гени из групе цикллина, одговорни за прогресију ћелијског циклуса (енгл. *Cyclin D*, *c-MYC*), затим гени са улогом у EMT процесу (*SNAIL*, *SLUG*), MMP (*MMP7*, *MMP14*, *MMP26*), различити мембрански маркери са улогом у повезивању ћелија (*CD44*, *Nr-CAM*), маркери матичности и маркери одговорни за резистентност ћелије на ксенобиотику (*ALDH1*, *ABCG2*, *SOX*, *LGR5*), компоненте ЕСМ-а (енгл. *Extracellular matrix* - ECM), као и многи други (Conacci-Sorrell и сар., 2003; Valenta и сар., 2012; Herbst и сар., 2014; Ramakrishnan и Cadigan, 2017; Šeklić, 2018; Zhao и сар., 2022).

Захваљујући β -катенин сигнализацији стимулише се пролиферација епителних ћелија интестинума, док су промене у његовој експресији и активности карактеристичне за ране стадијуме CRC-а (Conacci-Sorrell и сар., 2003). Обзиром да стоји у основи регулације различитих и често опозитних ћелијских процеса, β -катенин у интеракцији са другим регулаторним факторима дефинише судбину карциномске ћелије. β -катенин такође ступа у физичку и функционалну

интеракцију са SNAIL транскрипционим фактором у нуклеусу формирајући комплекс SNAIL/ β -катенин, што води директној активацији Wnt сигналног пута, иницијацији и прогресији ЕМТ-а у канцеру. Овај комплекс на ДНК молекулу стимулише експресију таргет гена Wnt пута (Zucchini-Pascal и сар., 2013).

SNAIL

SNAIL (познат и као SNAIL1) је транскрипциони фактор са врло важном улогом у ембрионалном развићу, али и прогресији канцера као главни регулатор ЕМТ-а (Baygi и сар., 2010; Wang и сар., 2013; Brzozowa и сар., 2015). Он такође регулише и ћелијски циклус преко репресије циклина, делује и као анти-апоптотски фактор, регулише ћелијску адхезију, функционише као фактор преживљавања ћелије и инхибитор је њеног старења (Baygi и сар., 2010).

Бројни сигнални молекули из микроокружења канцера индукују експресију овог протеина за различите ћелијске потребе. Међу различитим сигналним путевима који индукују његову експресију у току прогресије канцера, је и Wnt/ β -катенин пут. Када је овај пут активиран, GSK-3 β није у могућности да фосфорилише два циљана молекула ЕМТ, β -катенин и SNAIL, па се дешава њихова стабилизација у нуклеусу ћелија. Синергистичко дејство β -катенина и SNAIL-а омогућава ћелијама канцера да преживе током дисеминације и инвазије. Недавно је показана и функција Wnt/SNAIL-посредоване прогресије канцера (Wang и сар., 2013; Vu и Datta, 2017).

Главна функција SNAIL-а је ипак супресија Е-кадхерина на генском нивоу, и овај транскрипциони фактор у сарадњи са другим ко-репресорима индукује метилацију промотора Е-кадхерина, на тај начин заустављајући његову експресију (Baygi и сар., 2010; Wang и сар., 2013; Brzozowa и сар., 2015; Zhao и сар., 2019). SNAIL може да се веже и за сопствени промотор и тако регулише своју експресију. Поред тога, он регрутује специфичне ензиме који модификују хроматин до промотора својих таргет гена (Wang и сар., 2013). SNAIL може директно или индиректно индуковати експресију MMP2 и тиме појачати инвазивност ћелија.

Има улогу и у супримирању сигнала који иде преко естрогених рецептора, контролише метаболизам, појачава резистентност на хемиотерапију и рецидив тумора. Индукује матичност и активира програм самообнове ћелија изазивајући појачану експресију фактора матичности, као што су: NANOG, KLF4 и плурипотентног активатора OCT4. Међутим, његова најзначајнија карактеристика је свакако директан утицај на прогресију канцера у смислу стимулације агресивног понашања, инвазије и метастазирања (Wang и сар., 2013; Rossi и сар., 2020).

SLUG

SLUG (или SNAIL2) је још један регулатор из породице SNAIL транскрипционих фактора, што имплицира његову тесну повезаност са SNAIL-ом у активацији и контроли ЕМТ-а, како током канцерогенезе, тако и у самом CRC-у (Vu

и Datta, 2017). SLUG је описан као врло јак иницијатор ЕМТ процеса и одговоран је за супресију епителних маркера, и одржавање недиференцираног (матичног) стања у канцеру. Литературни подаци тврде да је инвазивни фронт CRC-а окарактерисан недиференцираним ћелијама са високим нивоом нуклеарног β -катенина и SLUG-а (Brabletz и сар., 2005). Прекомерна експресија SLUG-а заједно са SNAIL-ом је у вези са појачаним инвазивним, миграторним и метастатским потенцијалом, и слабим прогнозом за пацијенте оболеле од CRC-а. Генску експресију SLUG-а директно регулише SNAIL, а заједно стимулишу фиброзу која може настати у CRC-у, узимајући активно учешће у смањењу епителних маркера, првенствено Е-кадхерина. Уочено је да њихови нивои могу бити смањени у хипоксичним условима (Vu и Datta, 2017). SNAIL и SLUG се у процесима дедиференцијације и у циљу одржавања и регулације матичног стања повезују међусобно, формирајући комплекс који се директно везује за промоторске секвенце таргет гена са улогом у процесима диференцијације или одржавања матичног фенотипа (Tang и сар., 2017).

1.5. Веза ЕМТ-а и матичности - најагресивнији фенотип карциномских ћелија

Интерконекција између ЕМТ-а и стања матичности у карциному није непознаница, и ова два стања карциномских ћелија су у тесној вези. Оба су одговорна за метастатски потенцијал канцера, рецидив и резистенцију на конвенционалне терапеутске приступе у лечењу ове болести. Истраживања константно доказују да матичне ћелије канцера интензивно испољавају одлике ЕМТ-а, а према литературним подацима чак постоје и две врсте матичних ћелија канцера у малигном ткиву, стационарне и мобилне (Brabletz и сар., 2005; Yao и сар., 2016). Стационарне су уочене у епителним ткивима почетних стадијума канцера, међутим такви тумори немају способност ефективне дисеминације. Зато овакве стационарне матичне ћелије почињу да стичу додатне одлике, односно подлежу ЕМТ процесу. Комбиновањем одлика матичности и мобилности услед присуства ЕМТ-а, одлике које се иначе не комбинују у једној епителној ћелији, омогућава се дисеминација карциномских ћелија и формирање карциномске масе на секундарним локалитетима – метастаза. Мобилне карциномске матичне ћелије су у колоректалном карциному окарактерисане и повећаним нивоима β -катенина, акумулираним у нуклеусу, што је повезано са slabим прогнозама пацијента и присуством метастаза у организму (Brabletz и сар., 2005).

ЕМТ у матичним ћелијама канцера је потврђен и појачаном експресијом и корегулаторним понашањем два кључна фактора одговорна за оба процеса, NANOG-а и SLUG-а. Карциномске ћелије позитивне на NANOG, маркер матичности, имају интензивније експримиран SLUG и јачи метастатски потенцијал са израженим ЕМТ карактеристикама. Промена нивоа експресије овог маркера, утиче

на нивое Е-кадхерина и SLUG-а, и самим тим се може закључити да NANOG такође регулише ЕМТ у колоректалом карциному. Експериментално је утврђено и да NANOG директно регулише експресију SLUG-а везујући се за његов промотор на ДНК молекулу. NANOG/SLUG сигнални пут води у прогресију CRC-а стимулацијом ЕМТ-а са једне стране, и одржавањем матичног стања са друге (Yao и сар., 2016).

У другим типовима канцера, NANOG успешно регулише ЕМТ преко утицаја на SNAIL сигналинг (Liu и сар., 2016). Карциномске ћелије које подлежу ЕМТ-у такође поседују и одлике матичности.

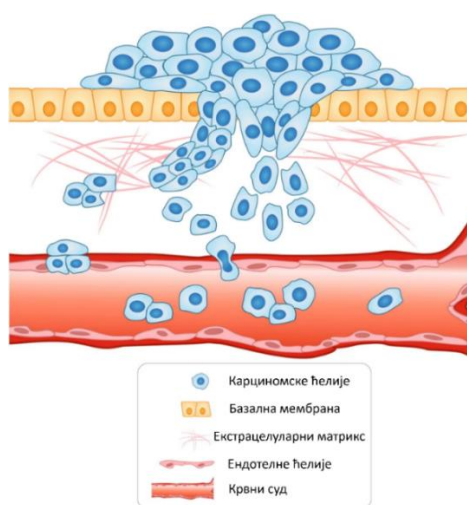
KLF4 регулише матично стање, а уједно и мезенхимска својства матичних ћелија CRC-а преко TGF- β 1/SMAD/SNAIL сигналне спреге. SNAIL се директно везује за промотор KLF4 гена супримирајући његову експресију (Taracha-Wisniewska и сар., 2020). SNAIL регулише и стимулише матичност у CRC-у (Hwang и сар., 2011). Матичне ћелије CRC-а испољавају ЕМТ фенотип, јер поседују високе нивое SNAIL-а, као и мезенхимске маркере виментин и фибронектин, док је ниво епителног маркера Е-кадхерина низак (Angius и сар., 2021). Прекомерна експресија SNAIL-а индукује ЕМТ и матични фенотип ћелија CRC-а (Fan и сар., 2012). Са друге стране, KLF4, као регулатор матичног фенотипа такође регулише и експресију SLUG-а (Lin и сар., 2012). OCT4/NANOG су идентификовани и као регулаторни транскрипциони фактори који се везују за промоторни регион SLUG гена и тиме утичу на ниво његове експресије (Chiou и сар., 2010).

Анализом молекуларних карактеристика ћелија које имају способност генерисања туморсфера, детектовано је симултано присуство панела биомаркера карактеристичних, како за ЕМТ, тако и за матичност (Е- и N-кадхерин, CD133, CD44v6, SNAIL, OCT3/4, SOX2, NANOG и LGR5) у најрезистентнијој субпопулацији карциномских ћелија (Turano и сар., 2018).

Све наведено имплицира да се карциномске ћелије карактеришу великом пластичношћу, у зависности од интра- и интерцелуларних сигнала, сигнала који долазе из спољашње средине, али и потреба тумора. Такође, оба стања, како ЕМТ, тако и матичност, су међусобно корегулисана и њихови нуклеарни регулатори се међусобно удружују, на просторно и временски различит начин. Ови фактори се могу повезати у комплексе, или деловати појединачно. У сваком случају, формирање различитих комбинација, као и везивање за проксималне или дисталне секвенце промоторских региона једног гена, може различито утицати на експресију тог гена. Такође, што се временског оквира тиче, они могу или симултано у једном тренутку да се вежу за ДНК, или то иде каскадно, а све за последицу има другачије исходе што се експресије једног, а затим и више гена са улогом у ЕМТ-у и матичности карциномске ћелије тиче. Може се само закључити да је врло компликована мрежа њихових интеракција, и да је пластичност карциномских ћелија врло велика, али оно што је главно је да се морају таргетирати оба стања, и ЕМТ и матичност, у циљу успешног третмана колоректалног карцинома.

1.6. Улога ЕМТ-а у процесима миграције и инвазије

Оно што лимитира раст и прогресију канцера је базална мембрана и различите компоненте окружујуће строме, појачан интерстицијални притисак, ограничен доток кисеоника и стварање реактивних кисеоничних врста, хипоксични услови и перманентно излагање ћелијама имуног система. Обзиром да постоји хетерогеност туморске масе, неке ћелије су слабије и подлежу ћелијској смрти, док друге стичу агресивни фенотип који подразумева активацију и регулацију различитих молекуларних и ћелијских механизма који директно зависе од ЕМТ-а. Овај процес им омогућава промену ћелијског облика и способност ремоделовања околног ткива у циљу стварања слободног простора за миграторно кретање карциномских ћелија. Карциномске ћелије активирају и подстичу процесе карактеристичне за нормалне, здраве ћелије, као што су миграција и инвазија, у циљу постизања оног што им је неопходно. Међутим, главни проблем је што физиолошки сигнали за окончање тих процеса изостају код карциномских ћелија (Krakhmal и сар., 2015). Прогресија метастатског канцера углавном прати устаљени образац према коме примарни тумор расте, увећава се, затим долази до инвазије ћелија канцера у околно ткиво, пробијањем базалне мембране ткива. Миграција ћелија се дешава кроз строму до циркулације, пробијањем зида крвних и лимфних судова између ендотелних ћелија (**Шема 6**).



Шема 6. Инвазија карциномских ћелија кроз екстрацелуларни матрикс и базалну мембрану, и интравазација.

(Извор: Novikov и сар., 2020, модификовано)

Затим следи интравазација (односно улазак у циркулацију), екстравазација (или излазак из циркулације), насељавање удаљеног органа, и коначно раст и развој секундарног тумора (Polachek и сар., 2012; Staneva и сар., 2019). Овај образац је познат и као метастатска каскада, а њен први корак је инвазија (Novikov и сар., 2020) у току које се дешавају промене у адхезионим везама ћелија са ванћелијским матриксом. Тиме се омогућава инвазија у околну средину, али и

секрецијом протеолитичких ензима који деградирају базалну мембрану и екстрацелуларни матрикс.

У аденокарциномима, ћелије CRC-а секретују од протеолитичких ензима највише MMP-2 и MMP-9, желатиназе које растварају колаген типа IV, есенцијални протеин базалне мембране ECM-а колона чија је доминантна компонента. Експресија ових MMP-а је виша у CRC-у него у мукози нормалног здравог колона и аденома (Godlewski и сар., 2020). Њихова секреција у инвазивним ћелијама је под контролом TGF β и EGF фактора раста, секретованих од стране епителних ћелија CRC-а. На генском нивоу, секрецију регулишу транскрипциони фактори SNAIL и SLUG (Martin и сар., 2013).

Регулација инвазије се дешава на више нивоа, генском, епигенетском и пост-транслационом. Хромозомална нестабилност је узрок повећане инвазивности у CRC-у, из разлога што изазива ЕМТ. Вишак или мањак хромозома (анеуплоидија и полиплоидија) су у вези са појачаним интензитетом ЕМТ-а и експресијом MMP гена, и тиме појачаном инвазијом CRC-а. Учестале амплификације гена такође имају за последицу прекомерну експресију гена, пре свега онкогена, као што су рецептори за факторе раста или регулаторе актинског цитоскелета и ћелијског инвазивног потенцијала. Мутације, инсерције и делеције појединих гена воде ка повећаној активности транскрипционих фактора SNAIL-а, SLUG-а, смањене експресије Е-кадхерина и индукцији ЕМТ-а. Мутиран *TP53* ген или његов губитак индукује ЕМТ, ремоделовање цитоскелета, и формацију инвадоподија. Мутације и у генима MMP-а појачавају инвазивни капацитет ових ћелија (Novikov и сар., 2020).

Последично долази до деструкције слојева зида колона и ректума и ствара се дисфункционални део црева. Инвазија карциномских ћелија дезинтегрише и нервна влакна локалног ентеричног нервног система узрокујући атрофију субмукозе.

Најчешће су процеси инвазије и миграције карциномских ћелија испреплетани и дешавају се истовремено, па се не може поставити јасна граница између њих, као ни одредити засебан инвазивни од миграторног фенотипа ћелија.

Ћелијска миграција је одлика ћелија која је у нормалним физиолошким условима одговорна за многе биолошке процесе, укључујући ембриолошки развој, формирање и одржање хомеостазе ткива, зарастање рана, имунолошку одбрану и инфламацију (Friedl и Wolf, 2003; Campbell и Casanova, 2016; Pijuan и сар., 2019; Staneva и сар., 2019). Међутим, ћелије које поседују миграторни потенцијал могу бити дерегулисане из неког разлога и допринети настанку и прогресији многих патолошких процеса, као што је канцер (Pijuan и сар., 2019).

Стицање миграторног потенцијала је кључан тренутак за карциномске ћелије јер омогућавања њихову инвазију и дисеминацију из примарних локалитета у удаљене органе, и успостављање леталних секундарних жаришта (Polaschek и сар., 2012). Литературни подаци показују да је за стицање миграторног потенцијала од изузетне важности ЕМТ процес (Campbell и Casanova, 2016).

Миграција и инвазија карциномских ћелија у суседна ткива, и интравазација у крвне/лимфне судове, су неопходни процеси у метастазирању канцера (Yamaguchi и сар., 2005; Ријуан и сар., 2019). **Метастазирање** је напредни ниво малигнитета, вишестепени процес који представља најчешћи узрок смрти пацијената, јер је метастазе врло тешко детектовати и могу остати у дормантном стању годинама након третирања примарног тумора (Yamaguchi и сар., 2005; Polachек и сар., 2012; Paul и сар., 2016; Tahtamouni и сар., 2019). Молекуларни механизми метастаза су слабо схваћени из разлога што је овај процес изузетно комплексан (Yamaguchi и сар., 2005; Tahtamouni и сар., 2019).

Метастатска каскада подразумева модулацију ћелијског фенотипа, динамичне хомеотипске и хетеротипске међућелијске интеракције, укључивање широког спектра ћелијских механизма од којих је састав и динамика цитоскелета, као и експресија адхезионих и протеолитичких ензима од изузетног значаја (Polachек и сар., 2012; Tahtamouni и сар., 2019). Додатне секундарне промене укључују производњу реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species* - ROS), развој хеморезистентних матичних ћелија канцера, мутирање гена за репарацију оштећења ДНК молекула, и многе друге (Tahtamouni и сар., 2019).

Миграција подразумева способност ћелија за промену у циљу постизања одговарајуће позиције у датом окружењу да би извршиле своју функцију (Ријуан и сар., 2019). Да би мигрирала, ћелија мора да модификује свој облик да би ступила у интеракцију са околним структурама ткива. Екстрацелуларни матрикс је супстрат, а уједно и баријера ћелији која мигрира (Friedl и Wolf, 2003). Миграција ћелија укључује развој цитоплазматских протрузија (избочина). Ћелија губи поларност, издужује се, развија цитоплазматске протрузије (избочине), а најчешће су то псеудоподије. Формација псеудоподија отпочиње издуживањем предње ивице ћелије, којом се затим причвршћује за структуре екстрацелуларног матрикса (Yamaguchi и сар., 2005). Након тога се предњи делови тела скупљају, чиме се ствара сила вуче која доводи до постепеног клизања тела ћелије и њеног задњег краја према напред (Friedl и Wolf, 2003). Ћелијске избочине које иницирају препознавање и везивање за екстрацелуларни матрикс могу бити прилично разнолике у морфологији и динамици: ламелиоподије, филоподије, псеудоподије или инвадоподије. Све оне садрже актинске филаменте, као и различите групе структурних и сигналних протеина, који им омогућавају динамичке интеракције са екстрацелуларним матриксом и могу се формирати или спонтано или под утицајем разних хемокина и фактора раста (Friedl и Wolf, 2003; Yamaguchi и сар., 2005). Иницијално избацивање и издужавање псеудоподија се покреће полимеризацијом и паковањем актинских филамената. Ове ћелијске протрузије затим долазе у контакт са екстрацелуларним матриксом и везују се за њега адхезионим молекулима, пре свега трансмембранским интегринима који формирају на том месту кластер интегрин - **фокални комплекс**, у циљу успостаљања **фокалног контакта** са подлогом (Friedl и Wolf, 2003; Yamaguchi и сар., 2005; Wu и сар., 2021).

Величина фокалног контакта је око 20 nm између ћелијске мембране и супстрата. Различити молекули из подлоге се везују за различите врсте интегрина, као што су фибронектин, ламинин, колаген и др. Други ћелијски рецептори који не припадају класи интегрина, као што је CD44 или CD26, протеоглигани по структури, такође интерагују са компонентама екстрацелуларног матрикса и учествују у сигнализацији неопходној за мотилитет ћелија (Friedl и Wolf, 2003). Такође је присутна непрестана интеракција и међузависност између интегрина и кадхерина током миграције епителних ћелија, и њихове адхезије за субстрат, а и сила која је потребна да би се раскинуле кадхеринске везе између две суседне ћелије умногоме зависи и од количине ангажованих интегрина (Polacheck и сар., 2012). Ангажовање интегрина и других адхезионих рецептора доводи до регрутовања и директног везивања површинских протеаза за интегрине који их усмеравају ка местима везивања. Протеазе разграђују компоненте екстрацелуларног матрикса у непосредној близини површине ћелије и деградација екстрацелуларног матрикса обезбеђује простор потребан за миграцију ћелије иза које остаје траг (Friedl и Wolf, 2003). Са друге стране, тип протрузија од значајности за инвадирање у крвне и лимфне судове су инвадоподије, које су такође богате актином и протеазама (Yamaguchi и сар., 2005). Екстрацелуларно микроокружење се састоји од пора дијаметра и до 20 μm , али и трака налик влакнима и каналима од 3 μm до 30 μm у ширини, 100 μm до 600 μm дужине. Када је површина попречног пресека интерфибриларних пора мања од $\sim 7 \mu\text{m}^2$, деградација матрикса је потребна да би се догодила миграција ћелија канцера која се углавном уочава дуж колагених влакана (Paul и сар., 2016).

Усмерена миграција ћелија канцера је углавном посредована како унутрашњим тако и спољашњим утицајима, при чему спољашње механичке сигнале (густина и тврдоћа екстрацелуларног матрикса) детектују интегрини и адхезиони рецептори, а хемијске сигнале детектују рецептори за хемокине и факторе раста (Polacheck и сар., 2012). Различити хемоатрактанти и фактори раста (EGF, енгл. *Insulin-like growth factor* - IGF1) се испуштају из крвних судова или од стране других типова ћелија и на тај начин стимулишу миграцију карциномских ћелија (Friedl и Wolf, 2003; Yamaguchi и сар., 2005). Неки од познатих хемокина који су детектовани у CRC-у су: CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL12, CXCL15. Као пример, за CXCL12 (или стромални фактор 1, енгл. *Stromal cell-derived factor 1*) и његов одговарајући рецептор CXCR4 (фузин) је уочено да имају значајну улогу у метастазирању CRC-а. CXCL12 секретују Купферове ћелије у јетри и ендотелне ћелије, а такође и ћелије CRC-а. Овај хемокин је карактеристичан и за метастазе CRC-а детектоване у плућним ткивима, а нивои CXCL12 хемокина су значајно виши у метастатским ткивима него у примарним лезијама. CXCL9 је такође појачано експримиран хемокин, а утврђено је да промовише метастазе CRC-а у лимфне чворове (Itatani и сар., 2016; Pączek и сар., 2020; Braoudaki и сар., 2022).

Током развоја и прогресије тумора, а нарочито у миграцији, ћелије канцера су такође и у сталном контакту са макрофагима који су инфилтрирани у самом ткиву тумора. Карциномске ћелије синтетишу и секретују CSF-1 фактор (енгл. *Colony stimulator factor 1*) којим подстичу секрецију EGF-а од стране макрофага, што им заузврат омогућава ефикаснију хемотаксију - кретање ћелија ка неком хемијском атрактанту. Са друге стране, миофибробласти изоловани из строме канцера колоне секретују у ванћелијски матрикс хепатоцитни фактор раста HGF (енгл. *Hepatocyte growth factor* - HGF), чиме индукују проинвазивну активност ћелија овог типа канцера (Polachek и сар., 2012).

Оно што је нарочито интересантно за карциномске ћелије је постојање два главна типа миграције, а то су **колективна** и **индивидуална** (појединачна) (**Шема 7**) (Friedl и Wolf, 2003; Polachek и сар., 2012; Wong и сар., 2014; Clark и Vignjevic, 2015; Campbell и Casanova, 2016; Paul и сар., 2016; Pijuan и сар., 2019; Ritch и сар., 2019; Staneva и сар., 2019; Wu и сар., 2021). Поменута класификација се базира првенствено на морфологији миграторних ћелија, параметрима међућелијских веза и интензитету адхезије за матрикс (Wu и сар., 2021).

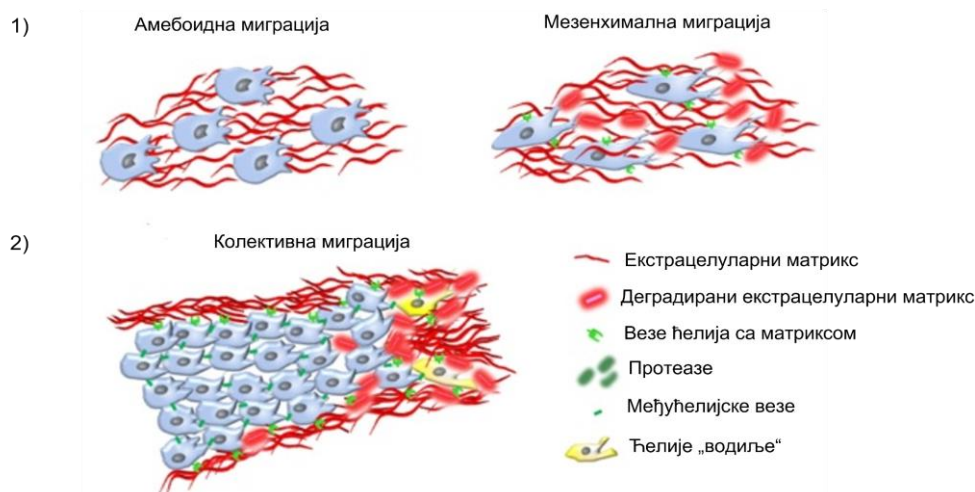
1.6.1 Типови ћелијске миграције

1.6.1.1 Колективна миграција ћелија

Колективна миграција подразумева кретање више ћелија као један ентитет, притом задржавајући и одржавајући јаке ћелијске везе међу собом (**Шема 7**) (Friedl и Wolf, 2003; Pijuan и сар., 2019; Ritch и сар., 2019; Wu и сар., 2021). Овај тип кретања ћелија канцера се одликује координацијом, а у многостави зависи од динамике актина, адхезије интегрина за протеине ванћелијског матрикса и протеолитичке деградације ванћелијског матрикса. Мигрирајуће кохезивне групе обухватају хетерогене туморске ћелије које одржавају предње-задњи поларитет и сарађују на хијерархијски начин (Wu и сар., 2021). Колективно кретање ћелија подразумева постојање мобилнијих ћелија које формирају водећи или инвазивни фронт и то су тзв. ћелије “водиље” које вуку друге мање покретне ћелије са собом (**Шема 7**) (Pijuan и сар., 2019; Wu и сар., 2021).

„Водиље” доносе колективне одлуке, а комуникација између ћелија се обезбеђује међућелијским спојевима у циљу пријема, интегрисања и преноса спољних сигнала, као и за вођење и пренос силе потребне за повлачење остатка групе ћелија (Pijuan и сар., 2019; Wu и сар., 2021). У оваквим кохезивним групама ћелије међусобно координирају активност цитоскелета, као и контакте са околним ткивом. У облику оваквих вишећелијских агрегата, ћелије могу снажно да приањају за површину екстрацелуларног матрикса протеинима фокалних адхезивних комплекса (Pijuan и сар., 2019). Такође, реорганизација екстрацелуларног матрикса се догађа услед дејства MMP-ова (најпре MMP-14, MMP-2 и катепсина) (Friedl и Wolf, 2003; Wu и сар., 2021).

Ћелије „водиље” разликују се од остатка групе коју вуку за собом како по морфологији, тако и по различитој генској експресији, пролиферативном, инвазивном и метастатском потенцијалу (**Шема 7**). Оне истражују своју околину протрузијама и адхезионим везама које се успостављају између интегрина и екстрацелуларног матрикса.



Шема 7. Типови миграције карциномских ћелија; 1) појединачна и 2) колективна миграција.
(Извор: <https://www.sciencedirect.com/>, модификовано)

Уочене су бројне сличности ових ћелија са ћелијама које мигрирају индивидуално, на пример у контракцији актинских филамента, адхезији за матрикс и појачаној експресији протеолитичких ензима. Студије су откриле да и стромалне ћелије могу да преузму улогу „водиља” током колективне миграције ћелија канцера. Чак су у већини случајева то били и фибробласти који протеазама ремоделују матрикс омогућавајући овакав тип миграције (Wu и сар., 2021).

Сматра се да је колективно мигрирајућа субпопулација настала из ћелија са вишом експресијом епителних биомаркера (Wong и сар., 2014), и показано је да епителни карциноми обично користе механизме колективне миграције (Friedl и Wolf, 2003). Многобројна истраживања су показала да већина епителних карцинома мигрира управо на овај колективни начин задржавајући динамичну регулацију главног маркера овог типа миграције, Е-кадхерин (Na и сар., 2020; Wu и сар., 2021). Са друге стране, јако важно откриће је и то да смањење Е-кадхерина у мигрирајућим ћелијама доводи до потпуног блокирања миграције. Поред тога, физичка веза између ћелија значи да кретање само једне ћелије утиче на понашање суседних ћелија. Дакле, активне мигрирајуће епителне ћелије су способне само за колективну ћелијску миграцију, а што је више ћелијске адхезије и спојева између ћелија, то ће процес миграције бити „колективнији” (Campbell и Casanova, 2016).

1.6.1.2 Индивидуална миграција ћелија

Међутим, епителне ћелије канцера могу и да подлегну ЕМТ-у, пређу у мезенхимски фенотип и започну **индивидуалну миграцију** (Paul и сар., 2016). Овакав тип миграције карциномских ћелија је уочен у ранијим стадијумима метастатског процеса (Pijuan и сар., 2019). Тада ћелије губе епителне карактеристике које су у вези са колективном инвазијом и миграцијом (снажни међућелијски контакти и ограничена покретљивост), а добијају мезенхимске особине повезане са индивидуалном инвазијом и миграцијом (ослабљени међућелијски контакти, повећана покретљивост и издужена морфологија - задобијање вретенастог облика тела). Експериментално је потврђено да ћелије које су подвргнуте ЕМТ-у мигрирају кроз ванћелијски матрикс као колективно организовани фронт са којег се у једном тренутку диспергују у виду појединачно мигрирајућих ћелија. Овакве појединачно мигрирајуће ћелије су брже, имају равније путање, и ефикасно се диспергују далеко од колектива ћелија од ког су се одвојиле. Још једна њихова особина је и смањена осетљивост на хемијске супстанце у поређењу са ћелијама које мигрирају колективно (Wong и сар., 2014).

Када ћелије индивидуално мигрирају то могу да раде на мезинхимални или амебоидни начин (**Шема 7**) (Friedl и Wolf, 2003; Paul и сар., 2016; Pijuan и сар., 2019; Wu и сар., 2021). Да би мигрирале на мезенхимски начин, ЕМТ или хибридни ЕМТ је неопходан као кључни процес у циљу одвајања појединачних ћелија од примарног тумора. У овом кораку је најважније раскидање међућелијских веза смањеном експресијом епителних маркера (првенствено Е-кадхерина и катенина), и истовремено, задобијањем одлика и експресијом маркера мезенхима (нарочито N-кадхерина, виментина и SNAIL-a) (Polacheck и сар., 2012; Campbell и Casanova, 2016; Paul и сар., 2016; Wu и сар., 2021). Експериментално је показано да у популацији у којој је индукован ЕМТ, са 95% мезенхимског фенотипа, доминирала је експресија N-кадхерина, виментина и SNAIL-a, док је експресија Е-кадхерина била знатно смањена (Wong и сар., 2014). Код мезенхимског кретања, везе ћелије са субстратом су релативно јаке, а дејство ензима MMP-ова им омогућава пролазак кроз матрикс (Polacheck и сар., 2012; Paul и сар., 2016; Wu и сар., 2021). Са друге стране, амебоидне ћелије имају неправилан облик који им ефикасно омогућава да се провуку кроз матрикс, чак и у одсуству MMP-ова који га ремоделирају. Амебоидне ћелије имају протрузије налик мехурићима, формирају слабе везе са субстратом, могу да се крећу независно од деловања MMP-ова захваљујући свом облику, и јако се брзо крећу кроз матрикс (Wu и сар., 2021).

До недавно се сматрало да епителне ћелије предузимају један од два пута да остваре миграцију: или да мигрирају колективно као епителне ћелије, или да се подвргну прелазу од епитела до мезенхима (ЕМТ) и мигрирају као појединачне мезенхимске ћелије (Paul и сар., 2016). Међутим, уочено је да постоје и ћелије које показују прелазе између колективне и индивидуалне миграције, тј. постоји

интерконверзија између колективних и индивидуалних миграционих фенотипова, што указује на фенотипску пластичност ћелија у сваком тренутку (Wong и сар., 2014; Paul и сар., 2016). Ово значи да прелазак из једног фенотипа у други није коначан, већ се може десити у сваком тренутку, што највише зависи од спољашњих услова и сигнала (Wong и сар., 2014). На пример, ћелије могу наићи на ограничене просторе за кретање који ограничавају обим међућелијских контаката, изазивајући дисперзију ћелија које затим крећу да мигрирају као појединачне ћелије (Campbell и Casanova, 2016; Paul и сар., 2016). На овај начин се може приметити значајан утицај локалног микроокружења на пластичност начина миграције ћелија канцера (Paul и сар., 2016). Ова понашања могу произаћи из релативних разлика у експресији транскрипционог фактора SNAIL-а који значајно утиче на модулацију фенотипске пластичности, дозвољавајући или враћање на епителни, колективни миграциони фенотип или одржавање мезенхимског, индивидуалног миграцијског фенотипа (Wong и сар., 2014).

Сада је јасно да мезенхимске ћелије често мигрирају показујући координацију и сарадњу која се приписује ћелијама које колективно мигрирају. Колективност и индивидуалност, епителне и мезенхимске одлике, су различите и независне карактеристике које се комбинују у различитим степенима, не само у различитим типовима миграција, већ чак и у различито време током миграције ћелије (Wu и сар., 2021).

Високо специјализована епителна ћелија, са потпуно развијеним везама и дефинисаним апикалним и базолатералним доменима, релативно је статична и поседује слаб миграторни капацитет, и није способна за колективну или индивидуалну миграцију. Међутим, све ћелије које поседују слабије епителне карактеристике (као што су мање или више динамичких веза и мање структурисана апико-базална површина) активније мигрирају (Wu и сар., 2021).

У многим туморима истовремено је присутна и појединачна и колективна ћелијска миграција. У принципу, што је слабије диференциран карцином, већа је вероватноћа да ће се тумор дисперговати на појединачне ћелије (Friedl и Wolf, 2003). До сада су обрасци појединачне и колективне миграције често откривени унутар истог микроокружења канцера (Wu и сар., 2021).

Све претходно наведено указује на то да је један од главних изазова за проналажење начина да се спречи ширење тумора и истражи разноликост механизма које ћелије канцера користе да мигрирају и инвадирају. Штавише, ћелије канцера могу да модификују своје механизме миграције као одговор на различите услове, због чега је важно разумети широк спектар начина на које ћелије постижу динамичке промене у режиму миграције, и како су оне међусобно повезане. Фокус истраживања треба бити на откривању молекуларних механизма који стоје у основи различитих типова миграције. Такав приступ би помогао разумевање процеса миграције карциномских ћелије и потенцијално

развиће нових стратегија лечења канцера (Polachek и сар., 2012; Campbell и Casanova, 2016).

1.7. Примарне ћелијске линије у преклиничким испитивањима

У преклиничким испитивањима на пољу истраживања канцера се интензивно користе ћелијске линије и доприносе бољем разумевању биологије тумора, као и развоју и унапређењу терапеутика. Међутим, комерцијално доступне имортализоване ћелијске линије се одликују различитим генетским модификацијама, које се такође и додатно акумулирају сваким пасажом, тако да представљају недовољно адекватне модел системе за испитивање, поготову када се пореде са примарним ћелијским културама. Примарне ћелијске културе карцинома, као *ex vivo* популације ћелија изоловане из узорака ткива, најчешће из језгра биопсија ткива, одражавају природно стање карцинома и његовог микроокружења, као и карактеристика матичности, што је у великој мери редуковано код стандардних комерцијалних ћелијских линија. Примарне ћелијске културе дају прецизнију слику карцинома у сваком погледу и погодније су за преклиничке анализе. Такође, компликовано је обухватити хетерогеност свих генетских и епигенетских варијанти у милионима пацијената, коришћењем само одређеног броја расположивих ћелијских линија карцинома (Richter и сар., 2021). Све ово указује на растућу потребу за коришћењем примарних ћелијских култура у експерименталним истраживањима на пољу проналажења и детаљнијих испитивања нових једињења са потенцијалним антиканцерским дејством.

1.8. Примена природних производа у лечењу колоректалног карцинома

Главни терапеутски приступи лечењу канцера, као што су хирургија, хемиотерапија и зрачење, до сада нису дали задовољавајуће резултате због својих нежељених ефеката које изазивају, међу којима, између осталих, спадају неуротоксичност и нефротоксичност. Самим тим, медицина се окреће њиховом побољшању употребом природних производа (Miyata и Sakai, 2018). Због нежељених ефеката радиотерапије и хемиотерапије и високе стопе морталитета, недавна истраживања указују на потребу да се дизајнира одговарајућа терапија за лечење канцера без нежељених ефеката (Asma и сар., 2022).

Природни производи, са изузетном хемијском разноврсношћу, се сматрају богатим резервоаром биоактивних једињења. Имају разноврсни и значајни терапеутски потенцијал и опсежно се истражују у погледу њихове активности у борби против канцера више од пола века (Huang и сар., 2021). Природне производе научници су увели у клиничку употребу, у сврху проширивања панела лекова против канцера. Међутим, имплементација биоактивних природних производа као

лекова остао је изазов. Бројни широко коришћени лекови у третирању канцера потичу управо из природних извора, као што су иринотекан, паклитаксел, доцетаксел, актиномицин, митомици, камптотексин, таксол и многи други. Нека од ових једињења су и даље главни ослонац у терапији канцера (Majolo и сар., 2019; Huang и сар., 2021).

Добијени из различитих извора, природни производи су коришћени за превенцију и лечење разних хроничних обољења већ неколико векова, а употреба природних агенаса показала је значајну терапијску ефикасност против малигнитета.

Поред свих наведених фактора који учествују у настанку CRC-а, утврђено је да начин исхране игра врло велику улогу и одговоран је за повећан ризик за настанак CRC-а, те природни репарати могу бити ефикасни у превенцији и лечењу CRC-а (Mármol и сар., 2017; Šeklić и сар., 2018; Jovanović и сар., 2022).

Изразита биолошки, и што је најважније, антитуморски потенцијал могу имати природни производи пореклом из биљака, животиња, гљива, лишајева, и др. У овим организмима синтетишу се многобројне активне супстанце, међу којима су и фенолне компоненте, са показаним циљаним дејствима на различите молекуларне механизме и сигналне путеве у карциномским ћелијама. Природни производи се од давнина користе у традиционалној медицини у различитим формама, па тако постоје докази о употреби екстракта, тоника, еликсира, тинктура, чајева, облога за лечење многих болести или у сврху побољшања општег здравља (Yuan и сар., 2016; Šeklić и сар., 2018). Такође, изолацијом појединачних компоненти из природних извора, и третманом на одређене модел системе, показано је њихово селективно и врло циљано дејство на специфичне молекуле и сигналне путеве у карциномским ћелијама, па су позната цитотоксична, антимигранаторна/антиинвазивна својства многих природних производа која се и даље интензивно испитују (Huang и сар., 2019; Elkhateeb и сар., 2023).

Већ поменуте фенолне компоненте, присутне у многим производима пореклом из природних извора, се синтетишу као секундарни метаболити биљака, али и гљива и лишајева, са изразито значајном функцијом у превенцији многих болести и доприносе очувању свеопштег здравља. Флавоноиди су класа фенола са доказаним антитуморским ефектима и циљаним дејствима на поједине сигналне путеве у туморским ћелијама, па се због тога употреба природних производа који их садрже интензивно пропaгира (Kopustinskiene и сар., 2020).

За коришћење пчелињих производа се знало још пре 9000 година, док је отприлике 1500 година пре нове ере још у Старом Египту забележена употреба меда у терапеутске сврхе. У религијским списима као што су Библија, Талмуд, Куран, затим у Старој Грчкој и Риму, као и широм Оријента, коришћени су пчелињи производи (мед, полен, матични млеч, пчелињи отров) у сврху одржања здравља и лечења различитих болести (Fratellone и сар., 2016; Wehbe и сар., 2019; Ali и Kunugi, 2020).

Последњих неколико деценија пчелињи производи су почели да се користе у многим деловима света све више као дијететски суплементи обзиром на висок садржај хранљивих и биолошко активних супстанци, па данас представљају фокус многих научних истраживања (Ali и Kunugi, 2020).

Апитерапија је алтернативни научни приступ оријентисан на одржавање здравља употребом пчелињих производа: меда, полена, прополиса, пчелињег отрова и матичног млеча (Fratellone и сар., 2016; Wehbe и сар., 2019). Овај тип комплементарне медицине укључује различите пчелиње продукте као терапеутске агенсе у превенцији и модификацији прогресије многих болести (Ali и Kunugi, 2020).

1.8.1 Матични млеч – одлике и дејство

Матични млеч представља један од најцењенијих пчелињих производа, и излучевина мандибуларних и хипофарингеалних жлезди пчела радилица (врсте *Apis mellifera* L.). Секретује се између 6. и 12. дана њиховог живота, а користи се за исхрану пчелињих ларви (Слика 1) (Izuta и сар., 2009; Shi и сар., 2014).



Слика 1. Изглед матичног млеча у ћелијама саћа са ларвама
(Извор: <https://sr.wikipedia.org/>)

Прва 3 дана живота се све ларве хране млечом, радилице се затим пребацују на исхрану која се састоји од полена и меда, а ларве матице настављају исхрану млечом (Spannhoff и сар., 2011; Orsolić, 2013; Honda и сар., 2015; Nascimento и сар., 2015).

Управо због појаве различитог нутријентног режима у раним ларвеним ступњевима, успостављају се и фенотипске разлике јединки пчелињег друштва (Spannhoff и сар., 2011).

Млеч има снажан развојни утицај на пчеле, јер овакав режим исхране резултира морфолошким, понашајним и физиолошким разликама матица од радилица. Матице имају продужени животни век у односу на радилице, ако не и најмање 20 пута дужи, и осим тога, млеч има улогу у сексуалној детерминацији будуће матице (Spannhoff и сар., 2011; Orsolić, 2013; Honda и сар., 2015; Nascimento и сар., 2015). Млеч је вискозна, желатинозна, густа, непрозирна маса, делимично растворна у води, густине 1,1 g/mL. Беле је до бледожуте боје, карактеристичне ароме, киселкасто–слатког укуса, са pH вредностима у опсегу 3,4-5,0 (Sabatini и сар.,

2009; Ramadan и Al-Ghamdi, 2012; Orsolić, 2013). Интензитет жуте боје и вискозност се повећавају стајањем, што је у корелацији са увећаним нерастворним азотним једињењима која улазе у његов састав, али и ензимским активностима између липидних и протеинских фракција (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).

Анализе узорака матичног млеча нису показале значајне разлике у саставу што се тиче географског порекла и фактора окружења (Sabatini и сар., 2009; Ramadan и Al-Ghamdi, 2012). Састав млеча је сталан, са слабо израженим разликама које које зависе од врсте пчела, и врло комплексан (Sugiyama и сар., 2012). По свом хемијском саставу, састоји се од воде (50 до 70%); протеина (9 до 18%) (албумини, α , β , γ глобулини, гликопротеини, липопротеини); шећера (7 до 18%) (глукоза, фруктоза, рибоза, малтоза, изомалтоза, гентиобиоза, тураноза, трехалоза, рафиноза); липида (1,5 до 8%) (феноли, стероли и глицероли, восак, неутралне масти, фосфолипиди, слободне органске киселине); минерала (0,7 до 1,5%) (К, Са, На, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, а у траговима и Si, Cr, Ni, Ag, Co, Al, As, Hg, Bi, Au, S, P, Ba, Sb, Мо, Cd, Pb, Sn, Те), витамина (В1, В2, В3, В5, В6, В7, В9, В12, пантотенска киселина, фолна киселина, инозитол, витамини Е, D, А, К, С) (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012; Orsolić, 2013; Shirzad и сар., 2013). Млеч поред свих наведених компоненти садржи нуклеинске киселине, ацетилхолин (Shirzad и сар., 2013), а од хормона, у млечу су пронађени и тестостерон, прогестерон, пролактин и естрадиол (Bogdanov, 2016). Глукоза чини 50-70%, а заједно са фруктозом може чинити и до 90% укупних шећера. Аминокиселине присутне у највећем проценту су: пролин, лизин, глутаминска киселина, β -аланин, фенилаланин, аспартат и серин (Sabatini и сар., 2009; Ramadan и Al-Ghamdi, 2012), а могу се наћи и друге врло биолошки активне аминокиселине као што су цистеин, тирозин, глицин, леуцин, валин, изолеуцин (Karadeniz и сар., 2011). Млеч је богат и аденозином (аденозин монофосфат (AMP) и аденозин монофосфат N1-оксид) (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012; Bogdanov, 2016).

Најважнија фракција поред протеинске је и липидна, која се највећим делом састоји од масних киселина (80-85%), и то 32% чини 10-хидрокси-транс-2-деценична киселина (10H2DA), 24% глуконска киселина, 22% 10-хидроксидеценична киселина (10HDA) и 5% дикарбоксилне киселине. Њихово присуство представља најважнији критеријум квалитета млеча, док се код осталих пчелињих прозвода не срећу (Sugiyama и сар., 2012). Липиди се примарно састоје од органских киселина, углавном слободних, са необичном структуром ретко уоченом у природи: моно-, дихидрокси и дикарбоксилне киселине са 8 и 10 угљеникових атома, које показују карактеристичан аранжман (Sabatini и сар., 2009; Bogdanov, 2016). Идентификоване су као одговорне за важне биолошке активности развића пчелиње колоније (Sabatini и сар., 2009). Флавоноиди су такође присутни у млечу, а главни су: флавоноли (кверцетин, кемпферол, галангин, фисетин), затим флаванони (пиноцембрин, нарингин и хесперидин) и флаволи (апигенин, акацетин, хризин и лутеолин) (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).

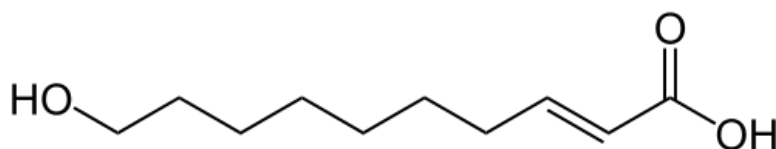
Спектар деловања матичног млеча на организам је вишеструк, па га данас медицина прихвата као стимулативно и регенеративно средство (Orsolić, 2013). Биолошке активности млеча су проучаване у *in vitro* експерименталним моделима, на лабораторијским животињама (мишеви, пацови, зечеви, хрчци), на животињама са фарме (овцама) и у клиничким студијама (Pavel и сар., 2011). Захваљујући свом комплексном саставу, млеч поседује мноштво фармаколошких дејстава од којих се издвајају: хипогликемично, хипохолестеремијско, хепатопротективно, хипотензијско, антитуморско, антибиотско, антиинфламаторно, имуномодулаторно, антиалергијско, неуротрофно (Izuta и сар., 2009; Karadeniz и сар., 2011; Pavel и сар., 2011; Sugiyama и сар., 2012; Mofid и сар., 2016). Активност млеча је показана на урођени и стечени имунитет и у третманима аутоимуних болести (Sugiyama и сар., 2012). Испољава ефекте против артеросклерозе, артритиса, улцера и индукује репарацију ткива (Shirzad и сар., 2013). Значајна дејства има против колитиса, индукује минерализацију у остеобластима, стимулише еритропоезу и продукцију колагена (Nascimento и сар., 2015).

Антиоксидативна активност млеча је показана кроз различите студије у *in vitro* и *in vivo* условима и темељи се на убрзању оксидативног метаболизма, повећању концентрације ензимских и не-ензимских компоненти антиоксидативног система, инхибицији продукције нитрита и липидне пероксидације (Pavel и сар., 2011; Sugiyama и сар., 2012; Orsolić, 2013). Млеч је врло ефикасан антиоксиданс, штити ДНК од оксидативног оштећења, а способност сузбијања слободних радикала се може повезати са садржајем слободних аминокиселина, као и полифенола (Karadeniz и сар., 2011; Orsolić, 2013; Bogdanov, 2016). AMP N1 оксид је компонента нађена само у млечу, а њен главни ефекат је на централни нервни систем у ком иницира диференцијацију неурона, астроцита и олигодендроцита, преко стимулације продукције GDNF (енгл. *Glial cell-derived neurotrophic factor*) (Pavel и сар., 2011; Bogdanov, 2016).

Ефективан је у перименопаузалним симптомима, као што је побољшавање хормоналне равнотеже и фертилитета код мушкараца и жена, повећавајући квалитет јајних ћелија и сперматозоида, а олакшава и симптоме менопаузе. Ове активности дугује компонентама које опонашају ефекте естрогена и на тај начин утичу на експресију различитих гена (Shirzad и сар., 2013).

1.8.2 Активна супстанца матичног млеча – транс-10-хидрокси-2-деценична киселина (10H2DA)

Јединствена и специфична компонента матичног млеча је 10HDA киселина која у свом несатурисаном облику - 10H2DA (**Шема 8**) испољава врло значајне биолошке активности (Suzuki и сар., 2008; Sugiyama и сар., 2012). За обе форме ове киселине, сатурисану и несатурисану, се сматра да постоје само у матичном млечу, а њихово присуство и концентрација представљају маркер квалитета овог природног производа (Ramadan и Al-Ghamdi, 2012).



Шема 8. Структура 10-хидрокси-2-деценоичне киселине матичног млека

(Извор: <https://en.wikipedia.org>)

У досадашњим истраживањима је описано више биолошких активности ове несатурисане масне киселине матичног млека, 10H2DA. Наиме, 10H2DA је потентна у стимулацији фибробласта на продукцију колагена и то путем секреције TGF- β за који је показано да индукује синтезу овог протеина (Koysa-Miyata и сар., 2004; Милајловић, 2015). 10H2DA има и улогу у регулацији експресије гена путем модификације епигенетских образаца на ДНК ланцу инхибирањем активности ензима хистон деацетилазе, што може дати за резултат реактивацију експресије епигенетски утишаног гена (Spannhoff и сар., 2011; Sugiyama и сар., 2012).

Ова киселина испољава модулаторну активност јонских канала у смислу повећавања пермеабилности неселективног катјонског канала за калцијум у епителним ћелијама бубрега (Terada и сар., 2011). Антиоксидативна својства ове киселине су такође показана, поготову у смислу смањења оксидационог стреса индукованог UV зрачењем (Милајловић, 2015).

Њен потенцијал у диференцијацији матичних прогениторних ћелија нервног система су експериментално испитивани, мада тачан молекуларни механизам до сада није утврђен (Hattori и сар., 2007). Такође, испољава ефекте на анксиозна и депресивна стања *in vivo* модел система (Ito и сар., 2012)

10H2DA има улогу и у модулацији имуног система, супримирајући продукцију MMP-а (код реуматоидног артритиса), азот монооксида и инхибирајући инфламаторне процесе у *in vitro* и *in vivo* истраживањима (Милајловић, 2015).

1.8.3 Антитуморски ефекти матичног млека и 10H2DA

Млеч је показао изузетна својства у превенцији настанка тумора, као и у спречавању прогресије различитих типова тумора у преклиничким студијама. Апликацијом млека у *in vivo* модел системе пре имплантације туморских ћелија, или мешањем са туморским ћелијама пре инокулације, утврђено је инхибиторно дејство овог природног производа на настанак, односно развој тумора (Townsend и сар., 1959; Shirzad и сар., 2013). Такође, уколико је тумор већ присутан у организму, млеч утиче на смањење његове величине (за око 50%), успорава раст и прогресију, и продужава животни век за око 20% (Bincoletto и сар., 2005; Shirzad и сар., 2013). Млеч аплициран оралним путем инхибира раст спорорастућих тумора (енгл. Ehrlich ascites, sarcoma-180 ascites) код пацова (Tamura и сар., 1987; и Bincoletto и сар., 2005). Овај природни производ је у *in vivo* студијама показао да значајно редукује метастатски потенцијал карцинома спречавајући формирање

метастаза у удаљеним органима (Orsolіć и сар., 2005; Kimura, 2008; Sugiyama и сар., 2012). Међутим, тачан механизам оваквог дејства млеча до сада није објашњен.

У *in vitro* студијама, млеч је инхибирао пролиферацију ћелијских линија карцинома дојке и простате (Nakaya и сар., 2007; Abandansari и сар., 2018; Аупа и сар., 2022), а показано је и да индукује повећање одређених параметара редокс статуса у ћелијским линијама неуробластома (Çalışkan и сар., 2021). На ћелијској линији колоректалног карцинома (Caco-2) је испољио антипролиферативни потенцијал и то модификацијом параметара редокс равнотеже (Filipiћ и сар., 2015).

Иако се ова дејства млеча у великој мери остварују и кроз модулацију имуног одговора (Sugiyama и сар., 2012; Shirzad и сар., 2013), значајна је чињеница да су његове естрогенске активности у *in vitro* и *in vivo* условима показане експерименталним путем (Mishima и сар., 2005; Suzuki и сар., 2008).

Матични млеч такође појачава цитотоксични ефекат цитостатика на ћелијским линијама канцера (Abandansari и сар., 2018).

Антитуморска активност млеча се углавном приписује киселини 10H2DA и први пут је објављена 1959. када су Townsend и сар. демонстрирали инхибицију развоја и раста тумора *in vivo*. Фракционисањем матичног млеча се дошло до закључка да је за овај ефекат заслужна киселина 10H2DA чија концентрација у млечу може бити у опсегу 0,8%–6,5% (Miyata и Sakai, 2018).

Ангиогенеза је неопходна за прогресију инвазивних тумора и формирање метастаза. Анти-ангиогена активност 10H2DA киселине је демонстрирана, при чему су и пролиферација, миграција и формирање крвних судова, индуковани VEGF-ом, инхибирани код HUVEC ћелија од стране 10H2DA, највероватније инхибицијом MMP-а (Izuta и сар., 2009; Sugiyama и сар., 2012).

Претходне студије су показале да 10H2DA испољава естрогену активност, интерагујући са естрогеним рецепторима, за које се директно везује. Ова активност се односи на естрогене рецепторе β типа (ER β) који припадају фамилији интрацелуларних нуклеарних рецептора, што указује да 10H2DA улази у ћелију и унутар ње испољава своје дејство (Suzuki и сар., 2008; Sugiyama и сар., 2012). Активацијом лиганд-зависних ER β -а долази до транслокације целог комплекса лиганд-ER β у нуклеус, и његово везивање за ERE секвенце (енгл. *Estrogen response elements* - ERE) на ДНК молекулу. На овај начин се врши регулација транскрипције гена са учешћем у пролиферацији, контроли ћелијског раста, диференцијације, метаболизма, али и прогресији канцера (Tang и сар., 2004; Mishima и сар., 2005; Suzuki и сар., 2008; Moutsatsou и сар., 2010; Pavel и сар., 2011; Nascimento и сар., 2015). Естроген утиче на експресију стотине гена у различитим ћелијама и ткивима (Tang и сар., 2004). Интрацелуларни механизам дејства киселине 10-HDA са естрогеним рецептором, омогућава интеракцију ове компоненте и са неким од интрацелуларних сигналних молекула чиме утиче на сигналне путеве у ћелији (Sugiyama и сар., 2012).

Апоптотски ефекат ове киселине је показан на ћелијама карцинома плућа посредством модулације реактивних кисеоничних врста, а њена најзначајнија активност у *in vitro* експерименталним испитивањима је супресија ћелијске миграције посредством регулације TGF- β 1 сигналног пута, и путем инхибиције експресије SNAIL, GSK-3 β , N-кадхерина, и виментина, а стимулисањем експресије E-кадхерина (Lin и сар., 2020).

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Хипотезе

- Један од главних фактора за настанак и прогресију CRC-а је начин исхране. Природни производи који се користе као храна, представљају извор специфичних биоактивних супстанци са значајним антитуморским дејством. У том смислу, неопходно је истражити биоактивне супстанце које би ефикасно смањиле раст и прогресију карцинома.
- Многобројна позитивна биолошка својства матичног млеча су позната, због чега се одувек користи у традиционалној медицини. Позитивна својства матичног млеча се углавном приписују незасићеној масној киселини 10H2DA, а огледају се у смањењу туморске масе и антиметастатском дејству. Циљ овог истраживања је испитати ефекте матичног млеча и 10H2DA на метастатски потенцијал испитиваних модел система, у чијој основи су молекуларни механизми миграције и инвазије, као и на процес ЕМТ-а одговорног за контролу ових механизма.
- Агресивне карциномске ћелије одликује присуство ЕМТ-а, који карактерише губитак маркера епитела и стицање мезенхимских одлика. Природни производи могу супримирају ЕМТ процес, па су истраживања ове студије фокусирана на потенцијал млеча и 10H2DA у инхибицији прогресије ЕМТ-а.
- Матичност је у блиској вези са агресивним фенотипом карциномске ћелије. У циљу одређивања степена агресивности, у имортализованим и примарним ћелијским културама CRC-а, испитивана је заступљеност матичног фенотипа преко маркера NANOG, KLF4, OCT3/4 и ALDH1B1, у третману матичним млечом и 10H2DA.
- Имортализоване ћелијске линије, као и примарна ћелијска култура, свака за себе, има место у преклиничким испитивањима. У оквиру ове студије испитиван је одговор на третмане имортализоване ћелијске линије изоловане из одређеног стадијума болести са једне стране, са одговором изолованих ћелијских култура из ткива оболелих пацијената са друге стране, и то на нивоу ЕМТ-а и матичности.
- Најагресивнији фенотип у популацији епителних ћелија, са аспекта метастатског потенцијала, карактерише напредни ЕМТ и изражена матичност. Детекција и карактеризација овог фенотипа је од великог значаја у примарним

културама ћелија изолованих из почетних и напредних стадијума CRC-а. У оквиру ове студије испитани су ефекти 10H2DA, најпотентнијег третмана, на присуство ове популације ћелија.

Циљ дисертације, на основу наведених хипотеза, је испитивање ефекта матичног млеча и киселине млеча 10H2DA, на молекуларне механизме миграције/инвазије и матичности имортализованих ћелијских линија и примарне ћелијске културе колоректалног карцинома. Уједно, циљ је дефинисати везу између ЕМТ-а и матичности преко испитиваних маркера у најагресивнијем фенотипу.

Специфични циљеви

1. Детерминација биоактивних компоненти матичног млеча
 - одређивање садржаја активне супстанце млеча, незасићене масне киселине 10H2DA.
 - одређивање фенолног профила матичног млеча.
2. Испитивање ефеката матичног млеча и 10H2DA на имортализованим ћелијским линијама колоректалног карцинома (SW-480 и HCT-116).
 - Одредити цитотоксичност третмана на ћелијским линијама колоректалног карцинома, као и на ћелијској линији здравих фибробласта.
 - Одредити антимиграторни потенцијал третмана са акцентом на индивидуалну и колективну миграцију ћелијских линија.
 - Испитати антиинвазивни потенцијал третмана кроз матрицу хидрогел.
 - Детерминисати молекуларни механизам дејства третмана праћењем промена у експресији протеина са кључном улогом у ЕМТ-у:
 - Е-кадхерин и цитоплазматски β -катенин, као маркери епителног фенотипа;
 - Нуклеарни β -катенин, SNAIL, N-кадхерин, виментин и α -SMA, као маркери мезенхимског (агресивног) фенотипа.
 - Испитати ефекте третмана на промену маркера матичности (NANOG и ALDH1B1) у ћелијским линијама колоректалног карцинома.
3. Анализа узорака добијених од пацијената са CRC-ом.
 - Изолација примарне ћелијске културе.
 - Одређивање заступљености епителног, мезенхимског и матичног фенотипа у примарној ћелијској култури.

- Анализа ефеката 10H2DA, изабраног третмана са најбољим дејством, на процентуалну заступљеност горе-поменутих фенотипова у примарним културама CRC-а.
- Одредити заступљеност популације најагресивнијег фенотипа у контролним и третираним узорцима изолованим из примарних култура CRC-а.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања реализован је делом у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Други део истраживања спроведен је у Лабораторији за биоинжењеринг, Института за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу.

Узорци туморског ткива су прикупљени на Клиници за гастроентерохепатологију, Клиничког Центра у Крагујевцу од стране гастроентерохепатолога у складу са Хелсиншком декларацијом.

3.1. Хемикалије и реагенси

Коришћене хемикалије и реагенси набављени су од различитих произвођача.

10H2DA је купљена од TCI Chemicals, Јапан. Метанол је набављен од LabExpert, Словенија. Трипан плаво је купљен од Sigma Chemicals CO., St Louis, MO, Америка. Медијум за гајење ћелија (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM), физиолошки раствор са фосфатним пуфером (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), фетални говеђи серум (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 0,25% Трипсин-EDTA, пеницилин и стрептомицин од GPCO, Invitrogen, Сједињене Америчке Државе. Диметил-сулфоксид (DMSO), 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид (MTT) и говеђи албумин из серума (*Bovine Serum Albumine*, BSA), кристал виолет, 2-(*N* морфолиноетан сулфонска киселина (MES) и изопропанол су купљени од SERVA, Немачка. Поливинил алкохол медијум је набављен од Fluka Analytical, Швајцарска, док је параформалдехид купљен од Merck, Немачка. Примарна антитела за β -катенин (цитоплазматски и једарни) су набављена од Invitrogen Corporation, Сједињене Америчке Државе. N-кадхерин примарно антитело набављено је од Abcam, Сједињене Америчке Државе, док је E-кадхерин примарно антитело набављено од BD Systems, Велика Британија. Примарно антитело за виментин је купљено од Dako, Glostrup, Данска, док је α -SMA било набављено од Elabsience, Сједињене Америчке Државе. ALDHB1 и NANOG од Santa Cruz Biotechnology Inc., Сједињене Америчке Државе Секундарно антитело конјуговано са Cy3 или Alexa 448, DAPI (*Diamidino-2-phenylindole*) боја за детекцију једара од Thermo Scientific, Сједињене Америчке Државе. ЕрCAM примарно антитело, као и секундарна антитела конјугована са бојама FITC, Alexa 700 и PE су набављена од BioLegend, Сједињене Америчке Државе. BD Cytotfix/Cytoperm Plus кит за проточну цитометрију је купљен од BD Biosciences, Сједињене Америчке Државе. Апсолутни етанол и изопропанол су набављени од Fisher BioReagents, Канада. Хлороформ је купљен од Alfa Aesar, Thermofisher, Немачка, а TRI Reagent од Ambion, Сједињене

Америчке Државе. Китови за RT-PCR и qRT-PCR су набављени од EURx, Пољска. Прајмери за β -actin, SLUG, SNAIL, OCT3/4 и KLF4 генску експресију су синтетисани од стране Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Сједињене Америчке Државе.

3.2. Третмани

У експериментима су коришћени следећи третмани:

- 1) Матични млеч је добијен као комерцијални производ кошница газдинства Ракобрадовић, Велика Плана (локација 44°20'02"N, 21°04'36"E), а сакупљен је током 2017. године (љубазношћу др Јелене Ракобрадовић, научног сарадника Института за Онкологију и радиологију, Београд);
- 2) Незасићена масна киселина матичног млеча - 10H2DA;

3.3. Карактеризација матичног млеча

3.3.1 Хроматографска анализа фенолних компоненти у матичном млечу

Хроматографска анализа фенолних компоненти у узорку матичног млеча је одрађена HPLC (енгл. **High-performance liquid chromatography - HPLC**) методом. Коришћен HPLC систем (Shimadzu, Kyoto, Japan) се састојао од дегасера (DGU-20A3), аналитичке пумпе (LC-20AT), мануалног инјектора (7125), детектора (diode array detector SPD-M20A) и система контроле (CBM-20A). Софтвер LC Solution 1.2 (Shimadzu, Kyoto, Japan) је коришћен за анализу добијених података. Сепарација је одрађена на колони Aqua-Q C18 (150 × 4,6 mm, 5 μ m) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts USA). Градијент елуирања који је коришћен: % 0–5 мин, градијент 5–60% В током 5–30 мин, и еквилибрисано још додатних 5 мин.

Киселост мобилне фазе А је постигнута додатком мравље киселине (0,1%) у воду, а мобилне фазе и Б ацетонитрилом. Брзина протока мобилне фазе била је 1 mL/мин, а таласне дужине детектора су биле 260, 290 и 360 nm, што је максимум апсорпције високе енергије фенолних киселина и флавоноида. Анализа је обављена на температури од 30°C.

3.3.2 Квантификација 10H2DA у матичном млечу

Узорак матичног млеча (30 mg) је хомогенизован, растворен у мобилној фази (метанол и вода: сирћетна киселина=100:1 v/v; 45:55%), вортексован 15 мин и филтриран (кроз филтер промера пора 0,22 μ m). За потребе хемијске карактеризације матичног млеча, односно анализе присуства и концентрације 10H2DA киселине у узорку матичног млеча коришћен је Shimadzu Prominence HPLC

систем. Изократски начин елуције изведен је помоћу мобилне фазе која се састоји од (А) метанола и воде: сирћетне киселине=100:1 v/v (В) (А:В=45:55%). Брзина протока је била 0,5 mL/мин, волумен убризгавања 20 μ L, док је рерна у колони била прилагођена на 35°C. Укупно време трајања је било 35 мин. Таласна дужина мониторинга за квантификацију 10H2DA је била подешена на 225 nm. UV/VIS спектар је праћен између 200 nm и 400 nm.

Основни раствор је припремљен растварањем 1 mg 10H2DA у метанолу (1 mL), док су за калибрациону криву одабрана стандардна разблажења концентрација: 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 6,25 μ g/mL, 3,125 μ g/mL и 1,56 μ g/mL. Експеримент је поновљен 3 пута, а концентрација истраженог једињења одређена је из области пикова, користећи једначину за линеарну регресију добијену из калибрационе криве (R^2 gt; 0,9989). Границе детекције (LOD) и квантификације (LOQ) за 10H2DA су утврђени под горе описаним хроматографским условима, док су домети линеарности одређени из калибрационих крива.

3.3.3 Припрема третмана

У третману ћелија коришћен је матични млеч који је од тренутка сакупљања па до реализације експеримената чуван на -20°C. Након одлеђавања, матични млеч је растваран у PBS-у, а затим у DMEM-у у циљу добијања почетне концентрације (основног раствора-штока) 1 mg/mL. Шток је затим растваран у стерилном DMEM-у да би се добиле радне концентрације у опсегу од 1 до 500 μ g/mL.

Киселина матичног млеча, 10H2DA, такође коришћена као третман, је најпре растварана у малој запремини концентрованог DMSO-а, а затим у стерилном DMEM-у како би се добио шток концентрације 100 mM. У циљу добијања радних концентрација опсега од 0,1 до 500 μ M, шток је разблаживан у DMEM-у. Концентрација DMSO-а у највишој коришћеној концентрацији у третману је износио 0,5%, што представља нецитотоксичну концентрацију DMSO-а за тестиране ћелијске линије (Hostanska и сар., 2007).

Зависно од примењених тестова, ћелијске линије су инкубирани са третманима у трајању од 24 сата или 24 и 72 сата, након чега су одређивани специфични параметри.

3.4. Модел системи

За потребе тестирања наведених третмана, коришћени су модел системи: имортализоване ћелијске линије и примарна ткивна култура.

3.4.1 Имортализоване ћелијске линије

У овој дисертацији, као експериментални модел систем коришћене су имортализоване адхерентне ћелијске линије добијене из American Type Culture Collection – ATCC:

1) **HCT-116**, ћелијска линија изолована из епитела колоректалног карцинома хуманог порекла, са хетерозиготном мутацијом у β -катенин генском алелу, позитивна на експресију трансформишућег фактора раста бета 1 (TGF β 1) и бета 2 (TGF β 2) (www.atcc.org);

2) **SW-480**, ћелијска линија изолована из епитела колоректалног аденокарцинома, по градацији окарактерисана као тип Б по Дјуку, са хетерозиготном мутацијом APC генског алела и недостатком другог алела, позитивна на експресију трансформишућег фактора раста бета (TGF β) и епидермалног фактора раста (EGF) (El-Bahrawy и сар., 2004);

3) **MRC-5**, ћелијска линија здравих фибробласта плућа, коришћена као контролна ћелијска линија.

Све три ћелијске линије су култивисане у стерилним фласковима (Т-25 cm³ и Т-75 cm³) у DMEM медијуму, обogaћеним са 10% FBS-а уз додатак антибиотика (100 IU/mL пеницилин, 100 μ g/mL стрептомицин) у инкубатору на 37°C и 5% CO₂.

3.4.1.1 Култивација ћелијских линија

Криотубе са залеђеним ћелијама су чуване у контејнеру са течним азотом (Spectrum Series 20), на -196°C до тренутка извођења експеримената за чије потребе су одлеђене ресуспендовањем садржаја криотубе у 5 mL комплетног медијума. Након центрифугирања (10 мин на 1200 rpm), медијум је аспириран, а талог ћелија је ресуспендован у 5 mL комплетног медијума. Ћелије су засејане у флак од 25 cm³, а наредног дана медијум је замењен (Mazur, 1970). По достизању конфлуентности од 80-90%, ћелије су пасажиране, односно пребачен је мањи број ћелија у други флак, са новим хранљивим медијумом (Freshney, 1983), употребом трипсина (1 mL 0,25% трипсина) чиме долази најпре до раскидања веза ћелија са подлогом и међућелијских веза. Овај процес трипсинизације се зауставља додатком комплетног медијума за гајење ћелија.

Обзиром да се у ћелијској култури налазе како живе (вијабилне) тако и неживе (невијабилне) ћелије, а за потребе експеримената користе се само вијабилне ћелије, потребно је утврдити вијабилност која се процењује бојењем

ћелија бојом трипан плаво. Боја улази у ћелије које имају оштећену мембрану и под микроскопом се ове мртве ћелије виде као плаво обојене, док живе ћелије остају необојене. Ћелијска вијабилност се утврђује мешањем суспензије са бојом у односу 1:1, након чега се суспензија налива на коморицу за бројање ћелија (хемоцитометар). Ћелије се броје у 2 велика дијагонална квадрата хемоцитометра под микроскопом, и средња вредност броја ћелија из два квадрата се уноси у одговарајућу формулу (Šeklić, 2018) да би се прерачунао број вијабилних ћелија по mL. Вијабилност ћелија коришћених у експериментима је била већа од 90%.

3.4.2 Примарна ткивна култура

За потребе анализа рађених у оквиру дисертације коришћени су и узорци ткива узети из пацијената са дијагностикованим колоректалним карциномом.

3.4.2.1 Изолација ћелија из узорака ткива

Ткива су узоркована од пацијената током колоноскопског прегледа који се рутински изводи од стране гастроентерохепатолога на Клиници за гастроентерохепатологију, Клиничког Центра у Крагујевцу. Узорковање ткива је вршено у складу са одобрењем Етичког Комитета Клиничког Центра у Крагујевцу (КЦ Крагујевац бр. 01-1627), уз добровољни пристанак пацијената који су били и писмено информисани о детаљима студије везаној за ову дисертацију. Узоркована су ткива из 10 пацијената са детектованим колоректалним карциномом која су прошла неопходна испитивања у Служби за патолошку и анатомску дијагностику Клиничког Центра Крагујевца. Испитивања на овим пацијентима су укључивала: патохистолошку анализу, одређивање хистолошког типа, одређивање нуклеарног градуса, рендгенографију плућа и грудног коша, анализу метастатских промена у јетри, TNM класификацију, одређивање карциноматоза (дисеминованог облика канцера). Ткива су узоркована из средишта тумора, јер је на периферији био присутан јак степен некрозе. Пацијенти од којих су узоркована ткива, нису имали, према претходној историји болести, детектована преканцерозна стања, и идентификовани карциноми су били спорадичног типа.

Узорци ткива (**Слика 2**) су преузимани у року од 1 сата након изолације из пацијената, транспортовани на леду у криовајли са медијумом за транспорт састава: DMEM, 200 IU/mL пеницилин, 200 µg/mL стрептомицин, гентамицин 100 µg/mL и амфотерицин В 12,5 µg/mL.



Слика 2. Изглед узорак ткива колоректалног карцинома добијених од пацијената, величине ~3 mm.

Даље процесирање узорака је рађено према већ описаном протоколу (Failli и сар., 2009). Узорци су подељени на два дела, при чему је један део био одређен за испитивање генске експресије, а други део за испитивање протеинске експресије.

Узорак ткива намењен за испитивање протеинске експресије је процесуиран тако да је ткиво било механички и хемијски (ензимском деградацијом) подељено на појединачне ћелије. Узорак је испиран неколико пута стерилним PBS-ом, измацериран стерилним скалпелом до делића величине 0,5-1 mm³, водећи рачуна да се одстрани крвни судови и масно ткиво, након чега је пребачен у стерилну микротубу и додато је 500 µL претходно загрејаног 0,25% трипсин-EDTA. Узорак је затим остављен на орбиталном шејкеру 5 мин након чега је ткиво додатно хомогенизовано интензивним пипетирањем. Оваква суспензија је пребачена у T-25 cm³ флашкове за култивацију ћелија и додато је 5 mL основног медијума за култивацију који се састојао од: DMEM, 10% FBS-а, 100 IU/mL пеницилин, 100 µg/mL стрептомицин, гентамицин 20 µg/mL и амфотерицин B 2,5 µg/mL (Failli и сар. 2009; Ali и сар., 2015). Добијена ћелијска суспензија је коришћена као контрола, док су третмани подразумевали додатак киселине 10H2DA у основни медијум за култивацију, тако да је њена финална концентрација износила 10 или 100 µM.

Након инкубације у трајању од 24 сата, ћелије које су адхерирале за дно флашка су трипсинизирани, а остатак изолованих ћелија из узорака ткива је одвојен од преосталих комадића ткива помоћу стрејнера (енгл. *Cell strainer*), са порама промера 70 µm.

На овим ћелијама је најпре одређиван утицај третмана на вијабилност методом бојења трипан плавом бојом, а затим су вршена испитивања експресије маркера ЕМТ-а и матичности на протеинском и генском нивоу, као што ће бити касније детаљније описано.

3.5. Методе коришћене у испитивањима антиканцерских ефеката третмана

3.5.1 Методе у испитивањима ефеката третмана на имортализованим ћелијским линијама

Основни тестови за одређивање антиканцерских дејстава тестираних третмана (МТТ тест, испитивање миграторног и инвазивног потенцијала) испитани су, пре свега, на имортализованим ћелијским линијама.

3.5.1.1 Испитивање цитотоксичности МТТ тестом

МТТ тест је колориметријска метода којом се одређује вијабилност ћелија и цитотоксичност тестиране супстанце (Mosmann, 1983). Тест се базира на реакцији која представља катализу редукције тетразолијумове соли (3-[4,5-диметилтиазол-2-]-2,5-дифенилтетразолијум бромид) жуте боје под утицајем митохондријалног ензима дехидрогеназе до формаза који се боји љубичасто. Интензитет добијене боје се квантификује спектрофотометријски, на оптималној таласној дужини од 550 nm. Ћелије се засејавају у микротитар плоче са 96 отвора, ~10 000 ћелија у 100 μL медијума по бунарићу. Након 24 сата инкубације на 37°C, ћелије се третирају са 100 μL испитиваног третмана одређене концентрације (за млеч концентрације су: 1, 10, 50, 100, 250 и 500 $\mu\text{g/mL}$, за киселину 10H2DA концентрације: 0,1, 1, 10, 50, 100 и 500 μM). Контролним (нетретираним) ћелијама се додаје по 100 μL комплетног медијума, а затим се плоча инкубира у дефинисаном временском периоду. Медијум из свих бунарића се аспирира, додаје се нових 100 μL комплетног медијума и 25 μL МТТ (концентрације 5 mg/mL). Плоча се инкубира 2-4 сата на 37°C у инкубатору, а затим се целокупни садржај бунарића аспирира и додаје 150 μL DMSO-а. Интензитет развијене боје, тј. апсорбанце се читавају на читачу за микротитар плоче (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Измерене вредности апсорбанци су пропорционалне броју вијабилних ћелија, а проценат вијабилних ћелија се добија израчунавањем односа апсорбанци третираних и контролних ћелија, помножен са 100. На основу добијених вредности за број вијабилних ћелија, изражених у процентима у односу на контролне ћелије, се процењује цитотоксичност третмана.

3.5.1.2 Испитивање миграторног потенцијала ћелија

Анализа колективног миграторног потенцијала

Колективна миграција ћелија је анализирана применом теста зарастања рана (енгл. *Wound healing*) – Скреч (енгл. *Scratch* – огреботина) есеја, који се базира на прављењу огреботине у уочљивом слоју ћелија и праћењу понашања и кретања ћелија током времена (Kosanić и сар., 2020). Ћелије на ивици ране почињу да

мигрирају, попуњавају и затварају тзв. „рану”“. Карциномске ћелије и здрави фибробласти плућа су засејане у плочи са 12 бунара (7×10^5 ћелија по бунару) и у року од 24 сата, када је достигнута конфлуентност од око 90-100%, медијум је аспириран, и на дну бунара је стерилним пластичним наставком направљена пукотина у конфлуентном слоју ћелија. Ћелије су потом два пута испране PBS-ом да би се уклониле ћелије које су откачене са дна бунара. Затим је додато 2 mL DMEM-а (у контроли) или третмана: матични млеч у концентрацијама 10 и 100 $\mu\text{g/mL}$, и 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM . Миграција ћелија је праћена инвертним NICON Eclipse-Ti микроскопом и микрографије су снимљене на 100x увећању после 0, 12 и 24 сати од третмана. Стопа попуњавања пукотине је квантификована мерењем растојања између ћелија на ивицама пукотине помоћу ImageJ софтверског пакета. Однос вредности третиране групе подељен је вредностима контролне групе, а затим помножен са 100 да би се добио проценат релативног простора пукотине који је упоређен са контролом. Упоредивањем слика од тренутка прављења скреча (0 сати) до истека одређеног периода (12, 24 сата), утврђен је степен миграције ћелија.

Анализа појединачног миграторног потенцијала

У циљу испитивања миграторног потенцијала појединачних ћелија, употребљене су методе: Transwell и RTCA.

Transwell метода се заснива на мерењу покретљивости ћелија засејаних у горњим бунарима који на дну садрже мембрану са порама промера 8 μm , који се након засејавања ћелија постављају у плочу са 24 бунара (24 well ThinCertTM, Greiner Bio-One) (Šeklić и сар., 2016). Ћелије засејане у горњим бунарима су пре засејавања изгладњиване 6 сати у медијуму без FBS-а, а затим засејане у бунариће са медијумом без FBS-а са или без третмана. Доњи бунари садрже комплетан медијум са атрактантом, који је у овом случају био 20% FBS. У експерименту су коришћене HCT-116 и SW-480 ћелије које су пре засејавања центрифугиране 3 мин на 800 грм. Након пребројавања, 1×10^5 ћелија је ресуспендовано у 500 mL DMEM-а без FBS-а који је садржао третмане: матични млеч у концентрацијама 10 и 100 $\mu\text{g/mL}$, а 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM , док су контролне ћелије засејане у DMEM медијуму без феталног серума. Овако припремљена ћелијска суспензија у третману је засејана у коморице са мембранским дном, а у бунарићима доње плоче је додат DMEM са 20% FBS-а. Након истека инкубације од 24 сата на 37°C у инкубатору ћелије су испране PBS-ом и фиксирани 4% параформалдехидом, у трајању од 20 мин. на собној температури. PBS је коришћен за поновно испирање, а ћелије са унутрашње стране мембране које нису мигрирале су уклоњене памучним штапићем за уши. Затим је у бунариће додат 0,1% раствор кристал виолета у 200 mM MES пуферу (pH = 6,0), у циљу бојења преосталих ћелија на мембрани. Након инкубације плоче у трајању од 10 мин, мембране су пребачене у нову плочу са 24 бунарића где су одбојене 10% раствором сирћетне киселине.

Апсорбанца је мерена на читачу за микротитар плоче (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA), на таласној дужини од 450 nm. Добијена апсорбанца је изражена је као оптичка густина (OD) и представља миграторни потенцијал ћелија. Резултати су прерачунати у односу на проценат вијабилних ћелија и као такви представљени.

Миграција појединачних ћелија је квантитативно анализирана и помоћу xCELLigence система (енгл. *xCELLigence real time cell analysis system* – RTCA, Roche Applied Science, USA) који омогућава увид у кретање ћелија у реалном времену. За потребе ове анализе, 4×10^4 ћелија је засејано у горње бунариће специјалне CIM плоче намењене за анализу на RTCA апарату. Остатак методе је идентичан Transwell методи, са разликом што се ћелијски миграторни индекс (енгл. *Cell index* – CI) прати електродама смештеним у дну бунарића CIM плоче које детектују сигнале у тренутку ћелијског причвршћивања за њих (Šeklić и сар., 2022).

Миграција ћелија је праћена у року од 24 сата, а RTCA систем бележи сигналне импеданце на сваких 15 минута. Резултати су представљени у виду CI вредности добијених помоћу RTCA софтверског пакета.

3.5.1.3 Испитивање инвазивног потенцијала ћелија

Инвазивни капацитет карциномских ћелија се карактерише њиховим кретањем кроз тродимензионалну матрицу и ремоделирањем исте. Инвазија SW-480 и HCT-116 ћелија је праћена модификованом Transwell техником, и есеј је адаптиран из претходно описане студије (Brekman и Neufeld, 2009). Горњи инсерти су обливени хидрогелом у количини од 30 μL , који је припремљен тако што је колаген (концентрације 4 mg/mL PBS-а) помешан са DMEM медијумом, 1 M раствором NaOH и стерилном дестилованом водом. Припрема хидрогела је вршена на леду, затим наливена у Transwell инсерте који су остављени у инкубатору на 37°C да се одвије полимеризација. Након тога је на овај танак слој хидрогела додата ћелијска суспензија у комплетном медијуму без третмана, за потребе контроле, или у комплетном медијуму са третманом (матични млеч: 10 и 100 $\mu\text{g/mL}$, и 10H2DA: 10 и 100 μM). Инсерти су убачени у плочу са 24 бунарића, са атрактантом истим као у претходном есеју, и остављени 24 сата да ћелије инвадирају кроз колаген и мембрану, док ћелије које имају смањен инвазивни потенцијал остају са горње стране. Ћелије које су инвадирале налазе се на доњој страни мембране инсерата, а боје се и анализирају према већ описаном протоколу (Brekman и Neufeld, 2009).

3.5.1.4 Анализа маркера ЕМТ-а

Методе коришћене за анализу на протеинском нивоу

Имунофлуоресцентна микроскопска метода

За потребе локализације и квантификације протеинске експресије коришћена је техника имунофлуоресценце. Имунофлуоресценца се користи за маркирање појединих ћелијских делова флуоресцентним бојама. Специфичност реакције антиген-антитело омогућава да се овом методом тачно и прецизно прати, како присуство и локализација, тако и дистрибуција одређеног протеина у ћелији или ткиву. Секундарно антитело као индикаторни молекул је обележено флуоресцентном бојом која на одређеној таласној дужини емитује светлост. Детекција се врши флуоресцентним микроскопом.

Протеинска експресија Е-кадхерина, цитоплазматског и нуклеарног β -катенина, N-кадхерина, виментина и SNAIL-а је евалуирана коришћењем имунофлуоресцентне методе која је детаљно описана у Šeklić и сар. (2016) НСТ-116 и SW-480 ћелије су засејане 4×10^4 ћелија по бунарићу на покровним стакалцима Thermo Fisher Scientific, New York) постављеним у плочи са 6 бунара (Thermo Fisher Scientific, New York) и третиране одговарајућим третманима у количини од 2 mL (матични млеч: 10 и 100 $\mu\text{g/mL}$, и 10H2DA: 10 и 100 μM) или само комплетним медијумом за контролне ћелије. Након инкубационог периода од 24 сата, ћелије су испране PBS-ом и фиксирани 4% параформалдехидом у трајању од 20 мин на собној температури. Након поновног испирања PBS-ом, за пермеабилizацију ћелија је коришћен 0,1% Triton-X у циљу детекције виментина, док је за детекцију цитоплазматског и нуклеарног β -катенина пермеабилizација ћелија одрађена помоћу 0,25% Triton-X. Протеинска експресија Е-кадхерина, N-кадхерина и SNAIL-а је комплетирана пермеабилizацијом ћелија у хладном метанолу (-20°C). Блокада неспецифичних везних места је одрађена помоћу 1% BSA у трајању од 20 мин након чега су покривна стакалца са ћелијама бојена специфичним моноклоналним примарним антителима (разблаженим у PBS-у према упутствима произвођача) у трајању од 1 сата на собној температури. Додавање секундарних антитела конјугованих флуорофорама Alexa Fluor 488 или Cy3 (1:200 разблажење у PBS-у) се вршило истовремено уз додавање DAPI боје за бојење ћелијских једара (1:1000 разблажење у PBS-у). Инкубација са секундарним антителима је трајала 1 сат на собној температури, након чега су покривна стакла са фиксираним и обојеним ћелијама су затим залепљене на предметна стакла помоћу поливинил алкохол медијума. Осушени препарати су снимани инвертним флуоресцентним микроскопом (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments Inc.) на филтерима одређених таласних дужина и микрографије су добијене на увећању од 600 $\times$. Припрема микрографија за даљу анализу се састојала од филтрирања истих на црно-беле у програму ImageJ, а затим је интензитет флуоресценце мерен и прерачунат у односу

на црну позадину и резултати су презентовани као интензитет релативне флуоресценце у односу на контролу и представљен у процентима (%). Обрада резултата је одрађена према већ детаљно описаној процедури (Šeklić, 2018).

Метода проточне цитометрије

Проточна цитометрија представља софистицирану методу за квалитативну и уједно квантитативну анализу појединачних ћелија у којима су циљани протеини обележени флуоресцентним бојама. Протокол према коме је ова метода изведена је већ претходно описан у Pavlovic и сар. (2018).

За потребе ове анализе, SW-480 и HCT-116 ћелије су засејане у плочу са 6 бунарића (5×10^5 ћелија по бунарићу) и након 24 сата када су се залепиле за дно бунарића замењен им је медијум комплетним DMEM-ом са третманом (MM: 10 и 100 $\mu\text{g/mL}$, и 10H2DA: 10 и 100 μM) или комплетним DMEM-ом без третмана за потребе анализе контроле, у количини од 2 mL по бунару. Након 24 сата од инкубације, ћелије су трипсинизирани, испране Јиржи пуфером (састава: BSA, PBS и натријум азид) и центрифугиране на 400 rpm/5 мин/4°C. За потребе испитивања експресије мембранског маркера α -SMA (разблаженог у PBS-у према упутствима произвођача), супернатант је одливан и додато је по 15 μL примарних антитела након чега је следила инкубација у трајању од 30 мин/4°C. Ћелије су испране Јиржијем и центрифугиране, а затим након одбацивања супернатанта додато им је 15 μL секундарног антитела PE. Инкубација се састојала од првих 30 мин/4°C, а затим још 30 мин на собној температури у мраку. Ћелије су затим испране Јиржијем и центрифугиране, одливан им је супернатант и додато 350 μL Јиржија.

Флуоресцентно обојене ћелијске суспензије су анализиране употребом FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences) апарата, где је у току извођења анализе на проточном цитометру регистровано 10000 догађаја. Очитани подаци су анализирани и обрађени помоћу FlowJo (FlowJo LLC, Becton Dickinson) програмског пакета. Резултати су представљени у виду процента популације ћелија позитивне на дати маркер (%).

Анализа маркера EMT-а на генском нивоу

Изолација информационе рибонуклеинске киселине (иРНК)

Из имортализованих ћелијских линија, изолована је иРНК водећи се већ описаним протоколом (Chomczynski и Sacchi, 1987). Ћелије су након 24 сата од третмана центрифугирани (MPW-150R; MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) у трајању од 10 мин на 1200 rpm, и хомогенизовани помоћу TRIzol-a. Након центрифуге (5 мин на 12 000 rpm/4°C) додат је хлороформ и узорци су енергично мућкани 15 сек, инкубирани на собној температури 2-3 мин и центрифугирани (15 мин на 12 000 rpm/4°C). Фаза супернатанта која је садржала иРНК је пребачена у нову микротубу, након чега је додат изопропанол у циљу преципитације иРНК у трајању од 10 мин. Након поновног центрифугирања (12 000 rpm/10 мин/4°C)

супернатант је уклоњен, док је преципитат испран у 70% етанолу. Након центрифугања на 7500 rpm/4°C/5 мин супернатант уклоњен, а преостали етанол је осушен на собној температури. Талог са иРНК је ресуспендован у 20 µL воде PCR чистоће, и инкубиран на 55°C на термоблоку (Thermomixer R thermoblock, Eppendorf, Merck, Darmstadt, Germany) 2-3 мин. Концентрација иРНК је мерена на спектрофотометру (Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA), а однос апсорбанци очитаних на 260 и 280 nm, који је био између 1,8-2,0, је био показатељ чистоће РНК узорка.

Реверзна транскрипција (RT-PCR)

иРНК је у комплементарну дезоксирибонуклеинску киселину (енгл. *Complementary DNA* – cDNA), преведена коришћењем кита за реверзну транскрипцију (reverse transcription kit NG dART RT, EURx Poland) на MultiGene OptiMax (Labnet International, Inc, USA) PCR уређају, према упутствима произвођача.

Квантитативна ланчана реакција полимеразе (qRT-PCR)

Квантификација релативне генске експресије је вршена коришћењем добијене комплементарне ДНК (Zhai и сар. 2005). Даља анализа релативне експресије циљаних гена у односу на контролни (енгл. *Housekeeping*) ген, β -актин, је вршена коришћењем комерцијално припремљеног qPCR кита (EURx Poland). Кит је апликован према упутствима произвођача, додати су одговарајући прајмери и цДНК (енгл. *Reverse* и *forward*), а реакција је одрађена на апарату Mic qPCR Cycler (Biomolecular Systems, Yatala, Australia), који је програмиран према упутствима произвођача. Маркери ЕМТ-а испитивани на генском нивоу у имортализованим ћелјским линијама су: *E-кадхерин*, β -катенин, *N-кадхерин*, *виментин* и *SNAIL*, а њихове секвенце су приказане у **Табели 2**.

Табела 2. Секвенце прајмера циљаних гена маркера ЕМТ-а (енгл. *Forward* и *reverse*)

Гени	Forward секвенца	Reverse секвенца
β -актин (ACTB)	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'
<i>E</i> -кадхерин (CDH1)	5'-GAACAGCACGTACACAGCCCT-3'	5'-GCAGAACTGTCCCTGTCCCAG-3'
β -катенин (CTNNB1)	5'-AAAATGGCAGTGCCTTTAG-3'	5'-TTTGAAGGCAGTCTGTCTGTA-3'
<i>N</i> -кадхерин (CDH2)	5'-GACGGTTCCGCATCCAGAC-3'	5'-TCGATTGGTTTGACCACGG-3'
Виментин (VIM)	5'-GGCTCAGATTTCAGGAACAGC-3'	5'-AGCCTCAGAGAGGTCAGCAA-3'
SNAIL	5'-TCAGACGAGGACAGTGGGAAAG-3'	5'-GCTTGTGGAGCAGGGACATTTC-3'

Добијени резултати у Real-Time PCR софтверу (miqPCR v2.8.13) у виду C_t вредности (енгл. *Cycle threshold* - C_t) су даље обрађени употребом $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ методе, где:

- ΔC_t вредност представља разлику између C_t вредности циљаног гена и C_t вредности контролног гена
- ΔC_{t1} представља разлику између C_t вредности циљаног гена и C_t вредности контролног гена у третираним ћелијама
- ΔC_{t2} је разлика између C_t вредности испитиваног гена у контролним ћелијама и C_t вредности контролног гена у контролним ћелијама.

3.5.1.5 Анализа маркера матичности

Маркери који карактеришу матични фенотип: ALDH1B1 и NANOG су испитивани у имортализованим ћелијским линијама, како у контроли тако и под дејством третмана ММ-а и киселине. Испитивања су вршена на протеинском нивоу, методом проточне цитометрије, при чему су употребљена одговарајућа примарна моноклонска антитела (разблажена у PBS-у према упутствима произвођача), и одговарајућа секундарна антитела: Alexa 700 и FITC.

Маркери ЕрСАР и АВСГ2 су испитивани применом методе проточне цитометрије према протоколу за бојење мембранских маркера, као што је већ описано. За потребе анализе унутрашњих интрацелуларних маркера ALDH1B1 и NANOG-а, ћелије су фиксирание употребом Cytofix-а и CytoPerm-а према упутствима произвођача, а затим је настављено према претходно описаном протоколу, са разликом што су ћелије са секундарним антителима инкубирание 30 мин/4°C, а затим још 30 мин на собној температури у мраку.

3.5.2 Методе у испитивањима ефеката третмана на ћелијама примарне ткивне културе

3.5.2.1 Анализа маркера у узорцима ткива – фенотипска детерминација ћелија на протеинском нивоу

Ћелије изоловане из ткивних узорака колоректалног карцинома добијених од пацијената су анализиране како у контроли (нетретиране ћелије), тако и под дејством одабраног третмана, који се показао као ефикаснији – киселине 10Н2ДА, у две концентрације 10 и 100 μ М, након 24 сата.

Анализа је вршена на протеинском нивоу методом проточне цитометрије у циљу дефинисања заступљености ћелијских фенотипова. Одабрано је по два маркера за сваки тип ћелијског фенотипа: епителне ћелије, мезенхимске (фибробласти) и матичне карциномске ћелије. За епителне ћелије одабрани су Е-кадхерин и ЕрСАР; за фибробласте виментин и α -SМА, док је за матичне карциномске ћелије одабрана комбинација NANOG и ALDH1B1 маркера. 5×10^5

ћелија изолованих из ткивних узорака је процесуирано према протоколу који је претходно већ детаљније описан.

За анализу епителног фенотипа који има најагресивнији карактер у погледу ЕМТ-а, дефинисана је комбинација маркера који говоре о епителном фенотипу ћелије која експримира мезенхимске и матичне маркере. У том смислу, од епителних маркера изабран је ZO-1, од мезехималних виментин, а матичних NANOG.

3.5.2.2 Анализа маркера ЕМТ-а и матичности на генском нивоу

Ћелије изоловане из ткивних узорака колоректалног карцинома пацијената су испитиване на нивоу генске експресије. Анализа је вршена код контролних (нетретираних ћелија), као и код ћелија третираних киселином 10H2DA, у две концентрације, 10 и 100 μ M. 24 сата након третмана ћелије су процесуиране у складу са протоколима за изолацију иРНК, реверзну транскрипцију и релативну експресију гена, претходно описаним. Гени који су испитивани у ћелијама примарне ткивне културе су: *SLUG*, *SNAIL*, *OCT3/4*, и *KLF4*, а њихове секвенце су приказане у **Табели 3**. Анализа релативне експресије циљаних гена је вршена у односу на контролни (енгл. *Housekeeping*) ген, β -актин.

Табела 3. Секвенце прајмера циљаних гена маркера ЕМТ-а и матичности (енгл. *Forward* и *reverse*)

Гени	Forward секвенца	Reverse секвенца
<i>SLUG</i>	5'-ACATACAGTGATTATTTCCCG-3'	5'-CGCCCCAAAGATGAGGAGTAT-3'
<i>SNAIL</i>	5'-TCAGACGAGGACAGTGGGAAAG-3'	5'-GCTTGTGGAGCAGGGACATTC-3'
<i>OCT3/4</i>	5'-ACGTAGGTTCTTGAATCCCGA-3'	5'-GGCTGAATACCTTCCCAAATA-3'
<i>KLF4</i>	5'-GGTGGCTGCCTCATTAATGT-3'	5'-ACTCGCCTTGCTGATTGTCT-3'

3.6. Статистичка обрада резултата

Сви експерименти су одрађени у три поновка и резултати су представљени у виду средње вредности $\pm$ стандардна грешка добијених обрадом података у SPSS (вер. 17, 2008) софтверу за статистичку анализу података. У циљу поређења добијених вредности коришћен је тест ANOVA овог програма, а $p < 0,05$ је сматрана статистички значајном разликом. За потребе анализе резултата добијених тестом зарастања рана и имунофлуоресценце, коришћен је програм ImageJ (вер. 1.52a, Schneider и сар., 2012).

4. РЕЗУЛТАТИ

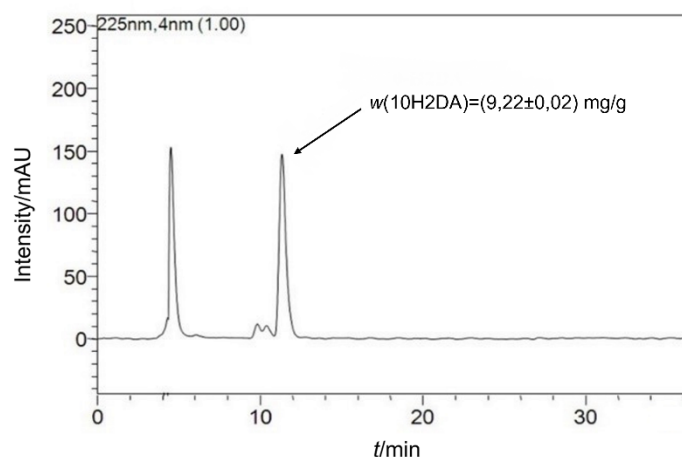
У овом поглављу докторске дисертације биће представљени резултати детерминације садржаја транс-10-хидрокси-2-деценичне киселине (10H2DA) у узорку матичног млеча (ММ), као и садржај и профил полифенолних компоненти у узорку ММ-а. У првом делу биће представљени резултати испитивања ефеката третмана ММ и 10H2DA на имортализованим ћелијским линијама SW-480 и НСТ-116 и то ефекти на вијабилност ћелија, миграторни и инвазивни потенцијал. Ефекти третмана на ниво протеинске и генске експресије маркера ЕМТ-а и матичности су такође приказани. За потребе процене цитотоксичности третмана коришћена је и здрава ћелијска линија фибробласта плућа, МRC-5.

У другом делу поглавља Резултати биће презентовани резултати испитивања узорка ткива колоректалног карцинома узоркованих из пацијената са потврђеном дијагнозом CRC-а. Истраживања биолошких ефеката (цитотоксичност, антимиграторни потенцијал и молекуларни механизми регулације миграције ових механизма) ММ-а и 10H2DA у појединачним третманима на ћелијама изолованих из узорка ткива колоректалног карцинома ће такође бити представљена у другом делу овог поглавља.

4.1. Анализа матичног млеча

4.1.1 Концентрација 10H2DA у узорку матичног млеча

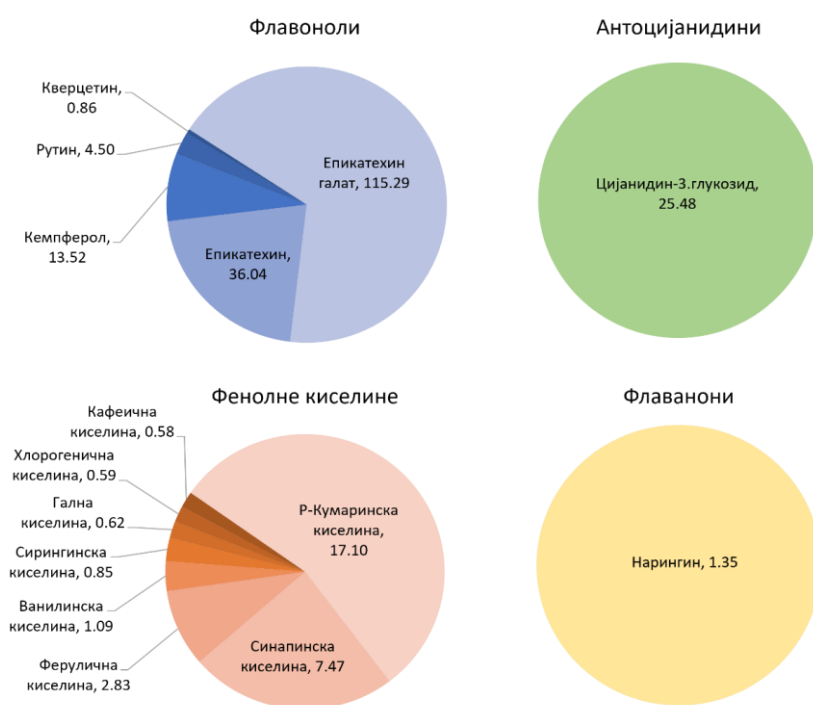
Употребом HPLC методе, установљено је да концентрација 10H2DA у тестираном узорку ММ-а износи $9,22 \pm 0,02$ mg/g или 0,92% w/w (**Графикон 1**).



Графикон 1. HPLC хроматограм садржаја 10H2DA детектоване у узорку ММ-а.

4.1.2 Детектовани флавоноиди у узорку ММ-а

Коришћењем методе HPLC, у узорку ММ-а је детектовано укупно 15 флавоноидних компоненти из групе флавонола, антоцијанидина, фенолних киселина и флаванона (**Графикон 2**). Од свих компоненти из групе флавонола, највећу концентрацију је имао епикатехин галат (115,29 $\mu\text{g/mL}$), праћен епикатехином (36,04 $\mu\text{g/mL}$). Присуство антоцијанидина цијанидин-3-глукозида је такође уочено у високој концентрацији (25,48 $\mu\text{g/mL}$). Од фенолних киселина, доминантна је р-кумаринска киселина (17,10 $\mu\text{g/mL}$), праћена синапинском киселином (7,47 $\mu\text{g/mL}$). Све остале компоненте детектоване у узорку ММ-а су имале концентрацију мању од 3 $\mu\text{g/mL}$ (**Графикон 2**). Овиме можемо закључити да је тестирани узорак ММ-а богат фенолним компонентама које су присутне у врло високим концентрацијама.



Графикон 2. Профил фенолних компоненти у узорку ММ-а добијен употребом HPLC методе. Резултати су изражени као концентрација фенолних компоненти у $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Ефекат третмана на ћелијским линијама

4.2.1 Вијабилност ћелија

Ефекти ММ-а и 10H2DA на вијабилност испитивани су на SW-480 и HCT-116 ћелијским линијама колоректалног карцинома, као и на здравим MRC-5 ћелијама. Процена утицаја третмана на вијабилност тестираних ћелијских линија је одређивана МТТ методом, 24 и 72 сата након третмана, а цитотоксичност третмана је представљена у виду IC_{50} вредности (концентрација која убија 50% ћелија)

(Табела 4). Ефекти третмана ММ-ом и 10Н2ДА на све три наведене ћелијске линије су такође приказани и графички у виду процента вијабилних ћелија 24 и 72 сата након третмана ММ-ом и 10Н2ДА на све три наведене ћелијске линије (**Графикони 1, 2 и 3** у Прилогу).

Третман ММ-ом није имао значајан цитотоксичан ефекат на SW-480 ћелијама 24 сата након третмана, штавише, ниске дозе су имале и благо пролиферативно дејство. Резултати показују да је након 72 сата уочен пад вијабилности од око 40% и то само у већим концентрацијама (**Графикон 1** у Прилогу). Међутим, ММ није показао инхибиторни ефекат који би смањив вијабилност ћелија више од 50%, самим тим IC_{50} вредности за овај третман су веће од 500 $\mu\text{g/mL}$ (**Табела 4**). Што се третмана киселином 10Н2ДА тиче, врло сличан ефекат је показан на овим ћелијама после краћег времена деловања (24 сата), где је вијабилност била смањена за око 10%. Након 72 сата 10Н2ДА је једино у дозама 10 и 100 μM успела да вијабилност SW-480 ћелија смањи за око 20% (**Графикон 1** у Прилогу). Ни за овај третман дакле није показана IC_{50} вредност ($IC_{50} > 500 \mu\text{M}$) (**Табела 4**).

Код НСТ-116 ћелијске линије, третман ММ-ом је имао благо пролиферативни утицај у нижим концентрацијама (1, 10 и 50 $\mu\text{g/mL}$), док су више концентрације испољиле благо цитотоксични ефекат смањивши вијабилност ових ћелија за око 15% (**Графикон 2** у Прилогу). Према резултатима за 72 сата од третмана, НСТ-116 ћелије су биле осетљивије на ММ који је у концентрацији 1 $\mu\text{g/mL}$ успео да стимулише пролиферативни потенцијал ових ћелија за 40% у поређењу са контролним вредностима. Супротно томе, више концентрације (100, 250 и 500 $\mu\text{g/mL}$) су смањиле вијабилност НСТ-116 ћелија за око 25% (**Графикон 2** у Прилогу). Овај третман није показао IC_{50} вредности за НСТ-116 ћелије ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) (**Табела 4**).

Третман 10Н2ДА киселином није испољио готово никакав утицај на тестирану ћелијску линију како за 24 сата тако и за 72 сата након излагања (**Графикон 2** у Прилогу), па самим тим није показао IC_{50} вредности ($IC_{50} > 500 \mu\text{M}$) (**Табела 4**).

У циљу тестирања ефеката ММ-а и 10Н2ДА и на здравој ћелијској линији, МRC-5 ћелије су биле подвргнуте третманима а резултати показују да је ММ испољио врло слабо дејство након 24 сата узрокујући пад вијабилности за 20%, док је након 72 сата дејство било још слабије (**Графикон 2** у Прилогу). Са друге стране, 10Н2ДА је имала после краћег временског излагања слаб цитотоксични ефекат супримирајући ћелијску популацију за око 25%, док је после 72 сата чак уочен пролиферативни утицај где су више тестиране концентрације изазвале скок од 20% у односу на контролу (**Графикон 2** у Прилогу). Самим тим, оба третмана нису показала IC_{50} вредности више од највише примењене дозе за одговарајући третман ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50} > 500 \mu\text{M}$) (**Табела 4**).

Табела 4. Цитотоксичност - IC₅₀ вредности третмана ММ (μg/mL) и 10H2DA (μM) на MRC-5, SW-480 и HCT-116 ћелијским линијама.

	IC ₅₀ (μg/mL)					
	24 h			72 h		
	MRC-5	SW-480	HCT-116	MRC-5	SW-480	HCT-116
ММ	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
10H2DA	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

4.2.2 Ефекти третмана на типове миграције у колоректалном карциному

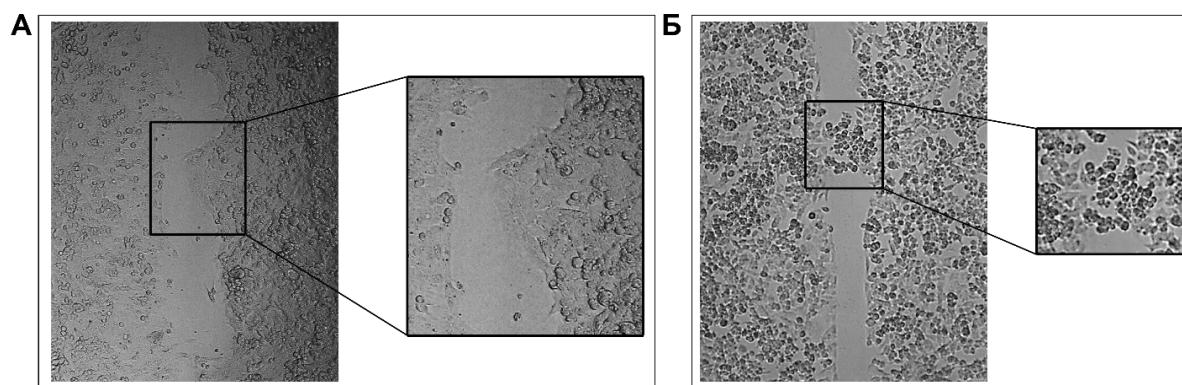
Поред тестирања цитотоксичности третмана, испитиван је и ефекат ММ-а, и 10H2DA на миграторни потенцијал ћелијских линија колоректалног карцинома. За дефинисање ефеката третмана на механизме миграције, коришћене су по две концентрације сваког третмана које нису показале значајну цитотоксичну активност. Ефекти третмана на миграторни потенцијал су детектовани и анализирани након 24 сата.

4.2.2.1 Ефекти третмана на колективну миграцију испитиваних ћелијских линија

Ефекти третмана на колективну миграцију ћелија су испитивани на SW-480 и HCT-116 ћелијама применом методе зарастања рана (Скреч).

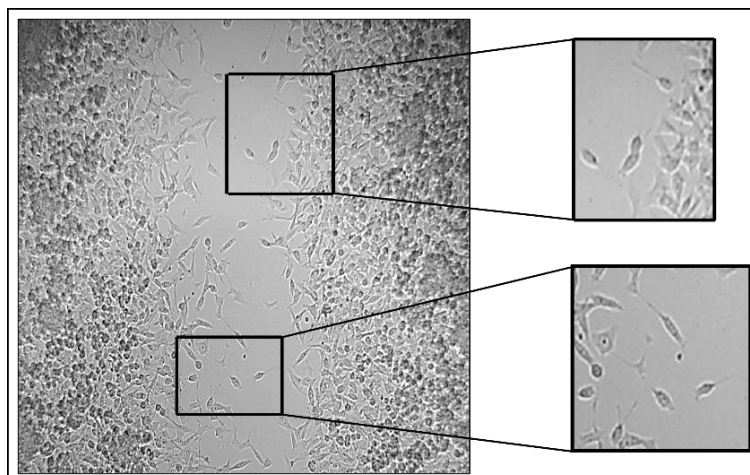
Најпре је детектован тип миграције код нетретираних ћелија сваке тестиране линије колоректалног карцинома појединачно.

На **Слици 3** је представљен колективни тип миграције нетретираних SW-480 ћелија, при чему је након одређеног времена после прављења пукотине у монослоју ћелија (~12 сати) уочено формирање миграторног фронта од стране лидер ћелија са једне стране пукотине (**Слика 3 А**), док је након неколико сати пукотина затворена од стране ћелија које су колективно мигрирале (**Слика 3 Б**).



Слика 3. Колективни тип миграције детектован у SW-480 ћелијској линији; А-миграторни фронт; Б-колективна миграција ћелија.

Насупрот SW-480 ћелијама, НСТ-116 ћелијска линија се одликује миграцијом појединачних ћелија кроз пукотину, као што је примећено у нетретираним ћелијама након ~12 сати од прављења пукотине у ћелијском монослоју (**Слика 4**). Ове појединачне ћелије полазе од ивице и мигрирају унутар пукотине ка другој страни са циљем да попуне овај празан простор.

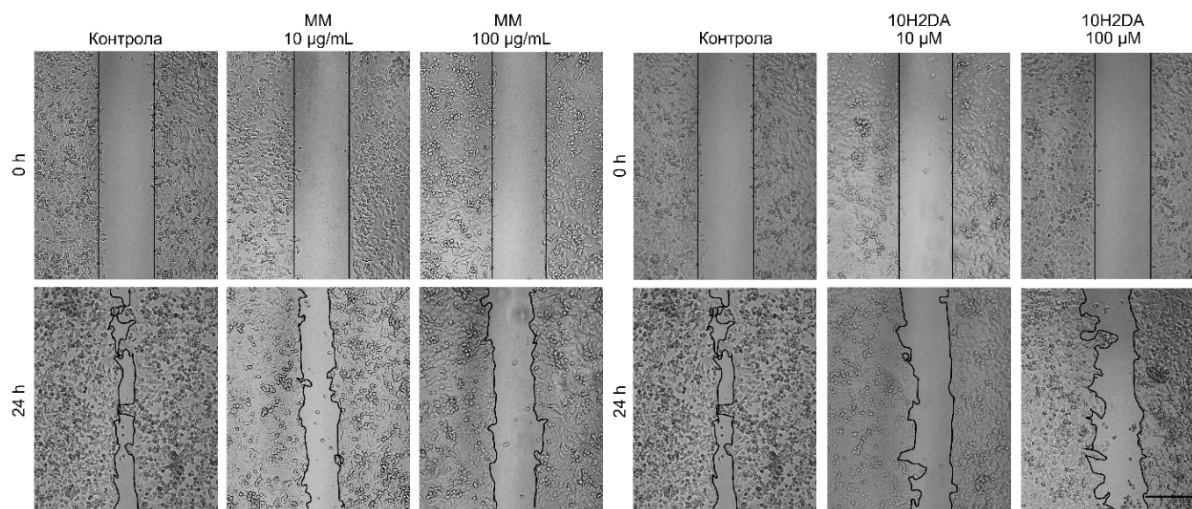


Слика 4. Индивидуални тип миграције детектован у НСТ-116 ћелијама.

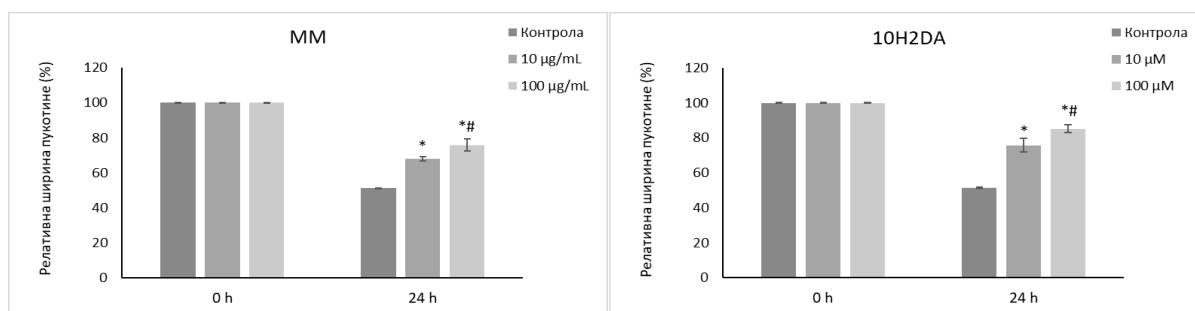
Ефекти третмана на колективну миграцију испитиваних ћелијских линија

На **Слици 5** је приказана колективна миграција SW-480 ћелија без третмана (контрола) и ћелија које су третиране ММ-ом или киселином 10Н2ДА у две одабране концентрације. Ћелије су снимане на 0 сати, а миграција у нетретираним ћелијама и ефекти испитиваних третмана су праћени након 24 сата. На микрографијама се може видети у контроли смањење пречника пукотине и попуњавање исте ћелијама које су колективно мигрирале са једне на другу страну преко празног простора (**Слика 5**). На истој слици се може уочити да је ММ супримирао миграторни потенцијал ове ћелијске линије након 24 сата, у односу на контролу. Овај ефекат ММ-а је био очигледно дозно-завистан, где је виша

концентрација 100 $\mu\text{g/mL}$ испољила израженије инхибиторно дејство на миграторни потенцијал SW-480 ћелија (Слика 5, Графикон 3).



Слика 5. Ефекти третмана на колективну миграцију SW-480 ћелија. Скала: 30 μm .



Графикон 3. Анализа ширине пукотине у SW-480 ћелијама након третмана је приказана у виду релативне промене ширине пукотине у односу на контролу (нетретирание ћелије).

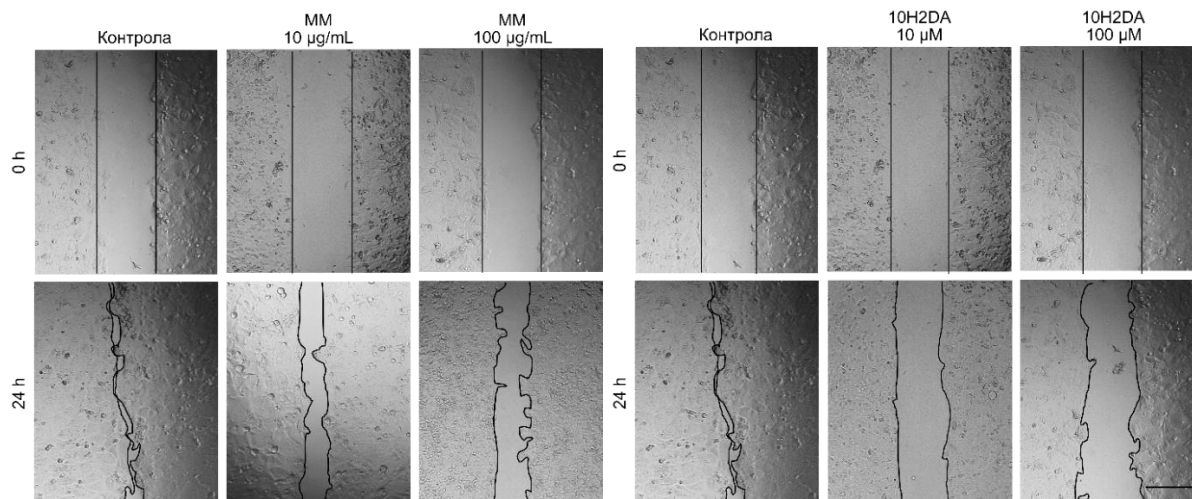
* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Обе испитиване концентрације киселине 10H2DA су значајно и дозно-зависно смањиле миграторни потенцијал SW-480 ћелијске линије, што се може видети на Слици 5 и Графикону 3.

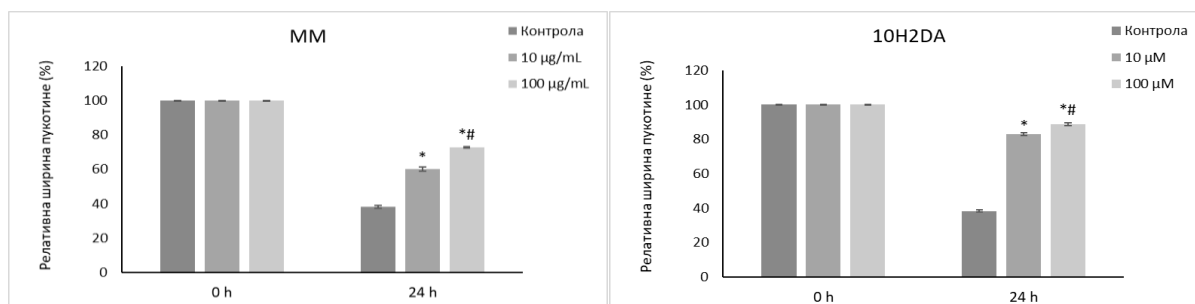
Резултати миграције ових ћелија указују на јаче инхибиторно дејство киселине у односу на MM након 24 сата од третмана.

За разлику од SW-480 ћелијске линије, код нетретираних НСТ-116 ћелија је уочена интензивнија миграција, односно брже попуњавање пукотине у ћелијском монослоју (Слика 6). Такође се може опазити и разлика у одговору НСТ-116 ћелија на третмане, у односу на SW-480 ћелије.

Према представљеним резултатима, ММ је успео да супримира значајно колективни миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија, у поређењу са нетретираним ћелијама (контролом), при чему је уочен дозно-зависни ефекат, тј. виша концентрација млеча (100 $\mu\text{g/mL}$) је испољила јаче супримирајуће дејство (**Слика 6, Графикон 4**).



Слика 6. Ефекти третмана на колективну миграцију НСТ-116 ћелија. Скала: 30 μm .



Графикон 4. Анализа ширине пукотине у НСТ-116 ћелијама након третмана је приказана у виду релативне промене ширине пукотине у односу на контролу (нетретиране ћелије).

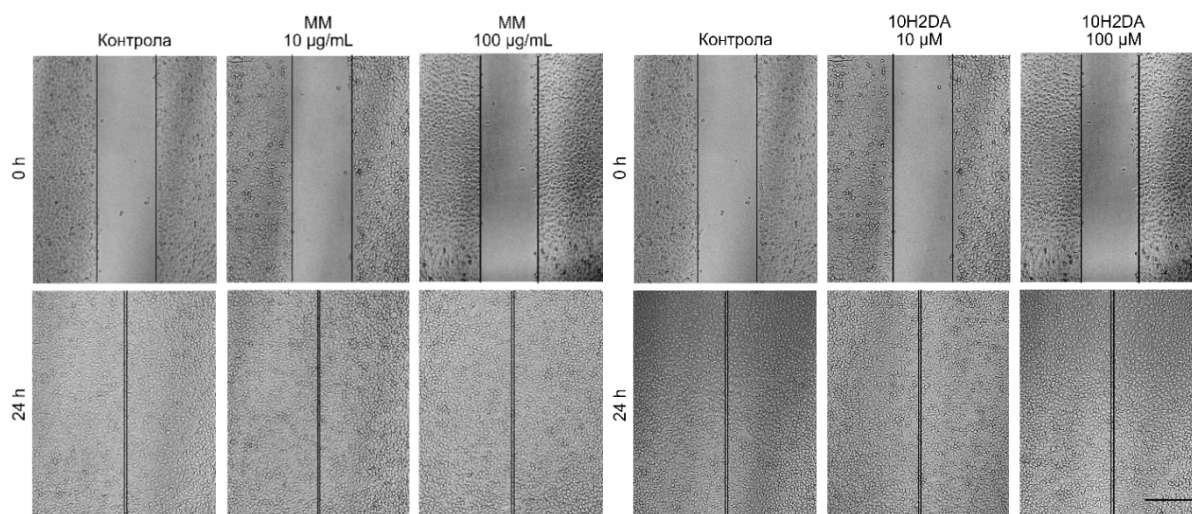
* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

У односу на третман ММ-ом, киселина 10H2DA је имала знатно снажнији и значајнији инхибиторни ефекат на миграцију ових ћелија и то обе примењене концентрације. Овај ефекат киселине је испољен на дозно-завистан начин (**Слика 6, Графикон 4**).

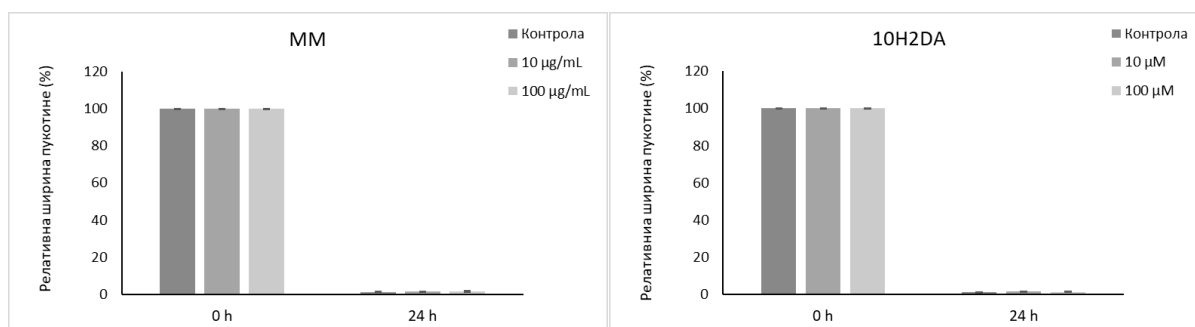
Генерално, НСТ-116 ћелијска линија је била мање осетљива на третман ММ-ом када се упоређи са SW-480 ћелијама, док је осетљивост на третман киселином била најзапаженија и знатно већа од SW-480 ћелија на овај третман.

Ефекти ММ-а и 10H2DA су додатно праћени и на здравим MRC-5 ћелијама 24 сата након примене третмана. Најпре, на микрографијама (**Слика 7**) се уочава велики степен миграције ових ћелија у контроли након 24 сата.

Приказани резултати на **Слици 7** и **Графикону 5** указују на неосетљивост ове ћелијске линије на оба третмана у обе примењене концентрације након истека инкубације ћелија са третманима.



Слика 7. Ефекти третмана на колективну миграцију MRC-5 ћелија. Скала: 30 µm



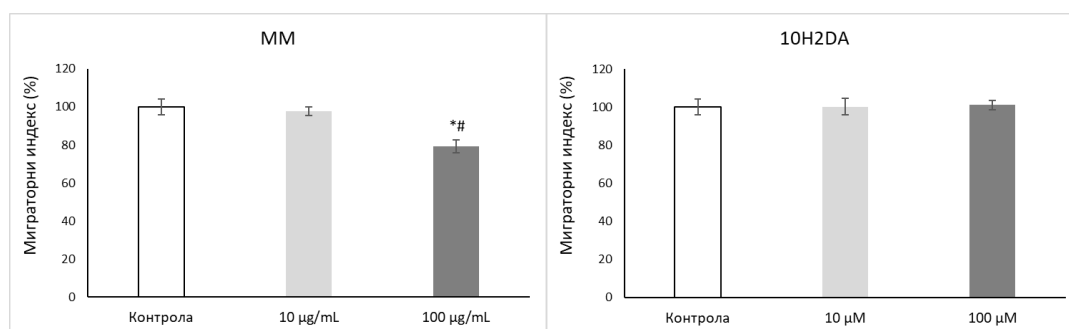
Графикон 5. Анализа ширине пукотине у MRC-5 ћелијама након третмана је приказана у виду релативне промене ширине пукотине у односу на контролу (нетретиране ћелије).

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

4.2.2.2 Ефекти третмана на појединачну миграцију ћелија

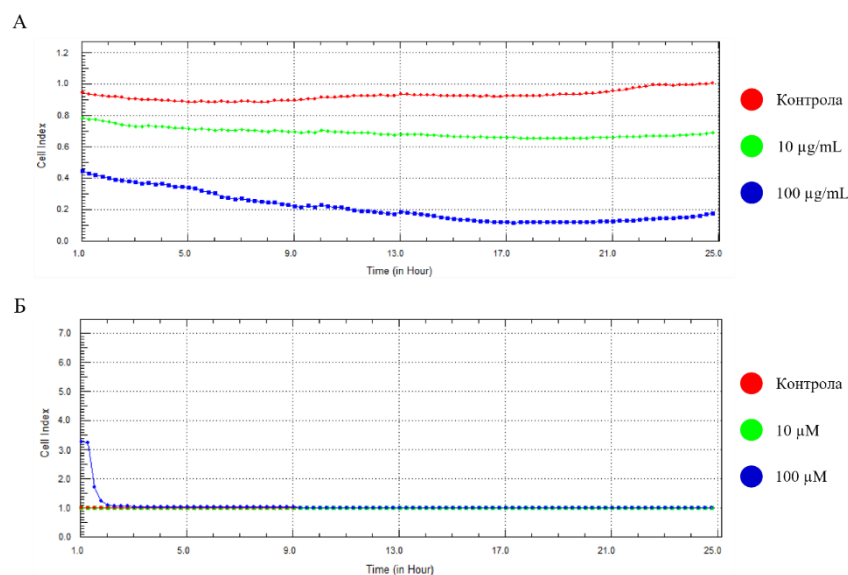
Ефекат ММ-а и 10H2DA на појединачну миграцију SW-480 и НСТ-116 ћелија је испитиван коришћењем Transwell методе. Одабране концентрације ММ-а су биле 10 и 100 µg/mL, док су за 10H2DA третман одабране 10 и 100 µM.

Миграторни потенцијал појединачних SW-480 ћелија је анализиран у контроли (нетретираним) и ћелијама третираним ММ-ом. Резултати добијени након 24 сата су показали да је овај третман дозно-зависно супримирао миграцију SW-480 ћелија, па се виша концентрација 100 µg/mL показала ефектнијом (Графикони 6 и 7).



Графикон 6. Миграторни потенцијал SW-480 ћелија.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

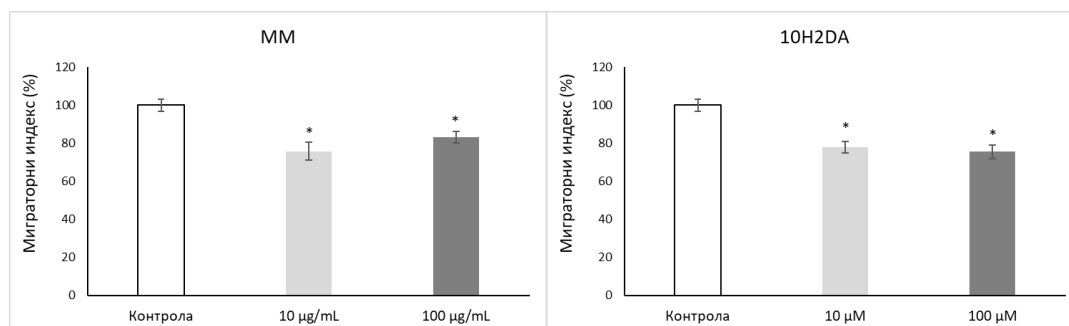


Графикон 7. Миграторни потенцијал SW-480 ћелија у контролним (нетретираним) и ћелијама третираним ММ-ом (А) и киселином 10H2DA (Б).

Са друге стране, обе концентрације 10H2DA киселине нису имале супримирајући ефекат на миграцију појединачних SW-480 ћелија након 24 сата (Графикони 6 и 7).

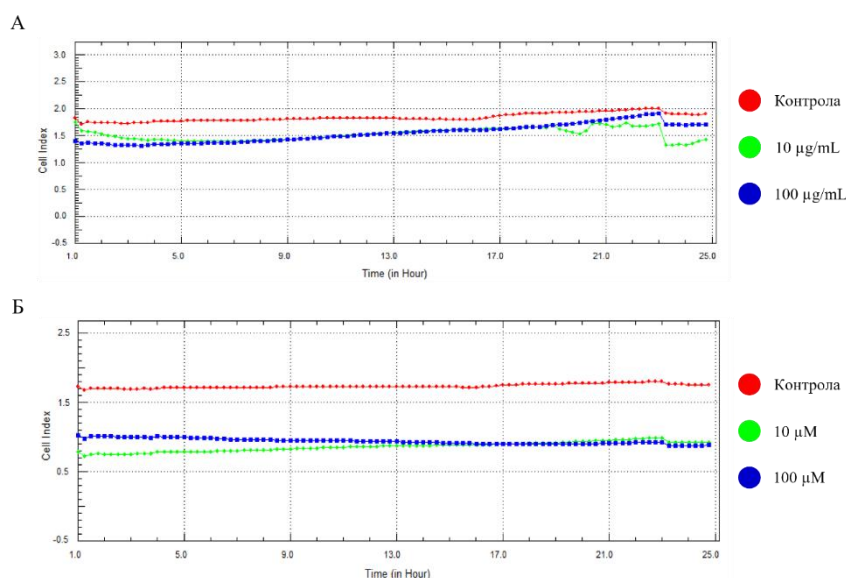
Генерално, ММ (100 $\mu\text{g/mL}$) је једини имао антимигранторну активност на овој тестираној ћелијској линији колоректалног карцинома.

Насупрот SW-480 ћелијској линији, миграторни потенцијал појединачних НСТ-116 ћелија је био инхибиран третманом ММ-ом, при чему је нижа концентрација 10 $\mu\text{g/mL}$ имала јачи ефекат, потврђено са обе коришћене методе (Графикони 8 и 9).



Графикон 8. Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.



Графикон 9. Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија у контролним (нетретираним) и ћелијама третираним ММ-ом (А) и киселином 10H2DA (Б).

Такође, супримирајуће дејство киселине 10H2DA је детектовано на НСТ-116 ћелијама након 24 сата и уочен је благи дозно-зависни ефекат, тј. виша концентрација (100 μM) је имала нешто јаче инхибиторно дејство (Графикони 8 и 9).

Добијени резултати показују да су НСТ-116 ћелије осетљивије на апликоване третмане од SW-480 ћелија, и да су и ММ и 10H2DA имали

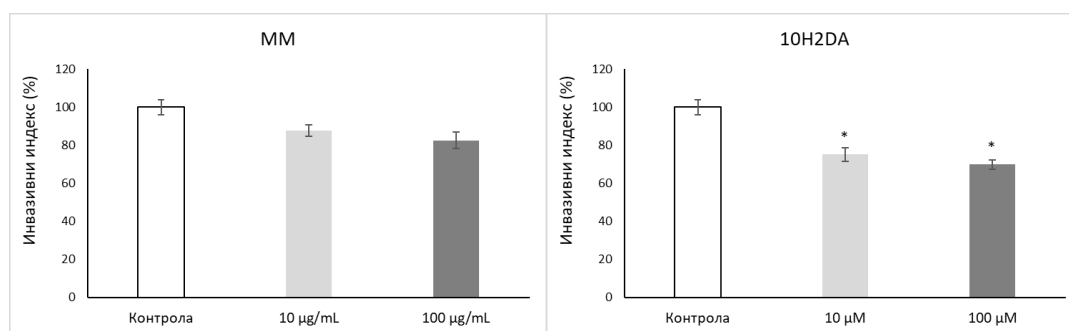
антимигранторни ефекат на овој ћелијској линији, при чему је 10H2DA испољила најзначајније ефекте (**Графикони 8 и 9**).

4.2.3 Ефекти третмана на инвазивни потенцијал испитиваних ћелија

Процена ефеката тестираних третмана на инвазивни потенцијал SW-480 и НСТ-116 ћелијских линија је одређивана помоћу модификоване Transwell методе са колагеном као матрицом. Ефекти су процењени након 24 сата након третмана.

Према добијеним резултатима, третмани су испољили ефекте на инвазивност SW-480 ћелија након 24 сата, у поређењу са контролним вредностима. Ефекат ММ је имао благи дозно-зависни инхибиторни ефекат на инвазивни потенцијал ових ћелија (**Графикон 10**). Киселина 10H2DA је такође супримирао инвазивност SW-480 ћелија по дозно-зависном обрасцу.

Генерално, киселина је имала јачи супресивни ефекат на инвазивни потенцијал SW-480 ћелија.

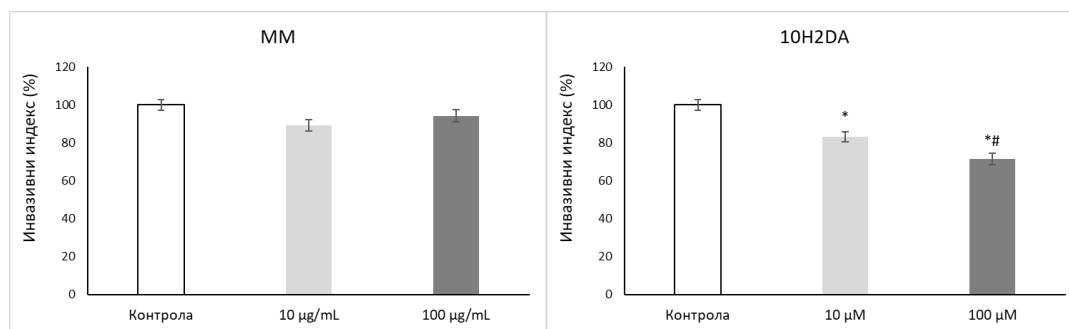


Графикон 10. Инвазивни потенцијал SW-480 ћелија.

* $p < 0,5$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Оба третмана су утицала на инвазивност НСТ-116 ћелија. ММ је супримирао инвазију ових ћелија кроз хидрогел, и нижа концентрација је имала јачи супресивни ефекат. Са друге стране, киселина је инхибирала инвазију НСТ-116 ћелија на дозно-зависан начин.

Од ова два третмана, НСТ-116 ћелије су генерално биле осетљивије на примену киселине као третмана (**Графикон 11**).



Графикон 11. Инвазивни потенцијал НСТ-116 ћелија.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

4.2.4 Ефекти третмана на протеинску експресију маркера ЕМТ

Протеинска експресија маркера епително-мезенхимске транзиције у ћелијским линијама колоректалног карцинома испитивана имунофлуоресцентном и техником проточне цитометрије је представљена у овом делу Резултата. Анализа је вршена у нетретираним и ћелијама третираним испитиваним третманима након 24 сата, а маркери који су детектовани су: епителни маркери Е-кадхерин и цитоплазматски β -катенин, затим регулаторни транскрипциони фактори нуклеарни β -катенин и SNAIL, а такође и мезенхимски маркери N-кадхерин, виментин и α -SMA.

4.2.4.1 Ефекти третмана на протеинску експресију епителних маркера

Експресија епителних маркера Е-кадхерина и цитоплазматског β -катенина, конситутивних компоненти комплекса који учествују у формирању међућелијских веза, је анализирана у нетретираним (контролним) и SW-480 и НСТ-116 ћелијама третираним ММ-ом и 10Н2ДА на протеинском нивоу помоћу имунофлуоресцентне методе, и резултати су представљени у наставку.

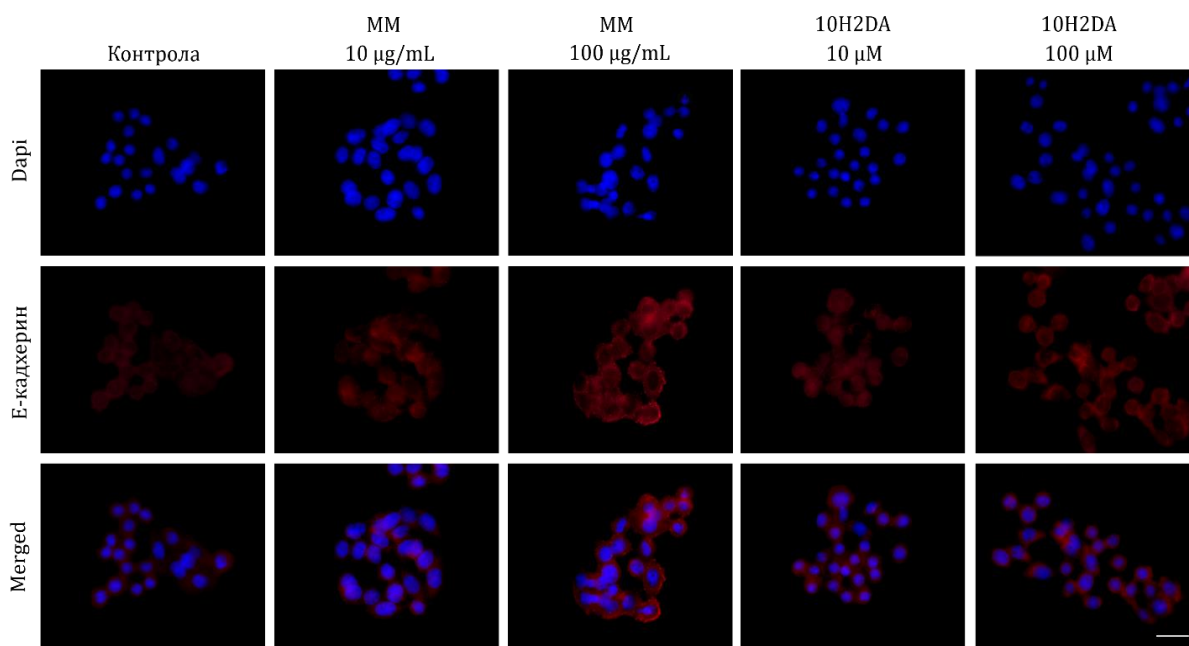
Протеинска експресија Е-кадхерина

Третман ММ-ом је довео до незнатног повећања експресије Е-кадхерина у нижој концентрацији, док је виша концентрација изазвала значајну стимулацију експресије овог протеина у SW-480 ћелијама (Слика , Графикон 12). На приказаним микрографијама (Слика) се може уочити концентрисање Е-кадхерина највише у зони ћелијске мембране, када су ове ћелије третиране ММ-ом у концентрацији 100 µg/mL.

Киселина 10Н2ДА, је са друге стране у обе примењене концентрације довела до повећања нивоа протеинске експресије Е-кадхерина у SW-480 ћелијама (Слика , Графикон 12). Нижа апликована концентрација је имала јачи ефекат. Е-кадхерин

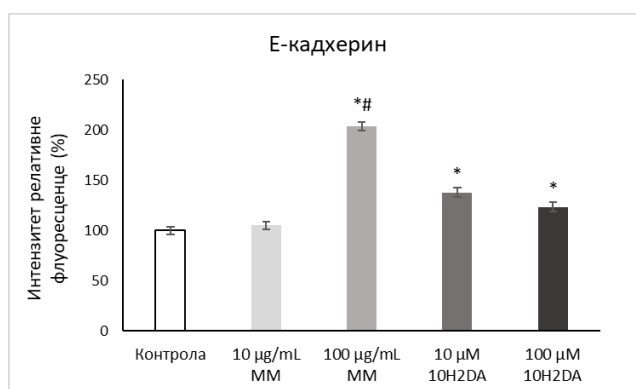
је детектован и у цитоплазми, али и у области мембране. 10H2DA у концентрацији 100 μM индуковала је повећање нивоа Е-кадхерина који је такође лоциран претежно у зони ћелијске мембране (Слика).

SW-480 ћелије су генерално биле осетљиве на примену третмана, како ММ-а тако и киселине, који су успели да доведу до значајног повећања експресије Е-кадхерина, у поређењу са контролом, што је у корелацији са резултатима за миграторни потенцијал ових ћелија.



Слика 8. Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3). Скала: 50 μm .

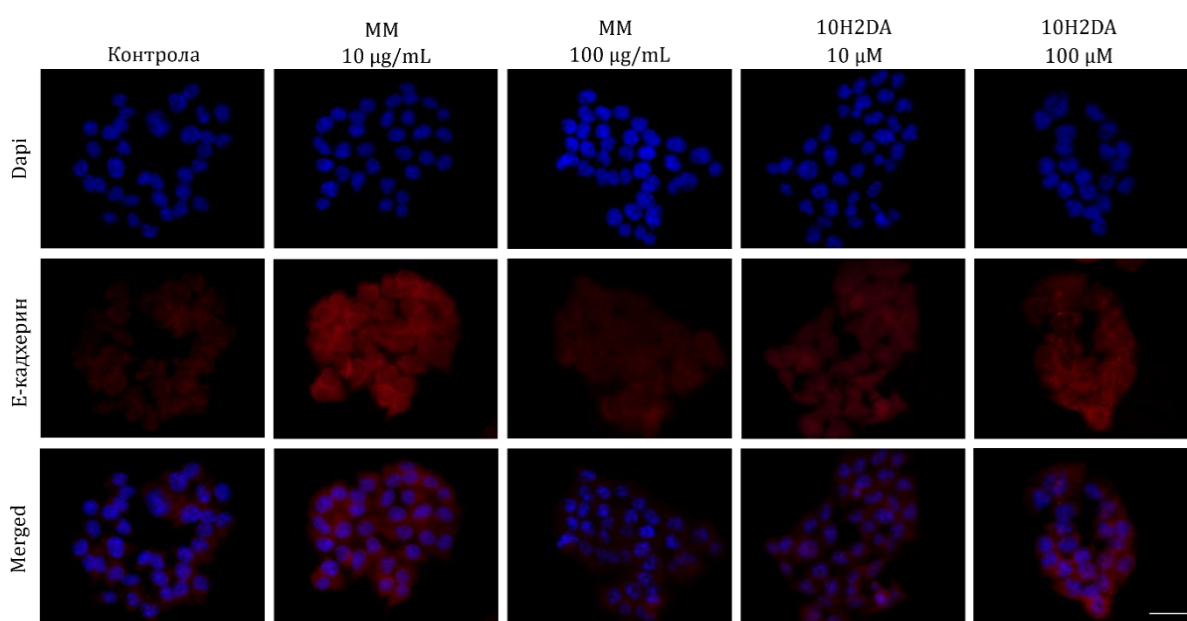


Графикон 12. Интензитет протеинске експресије Е-кадхерина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

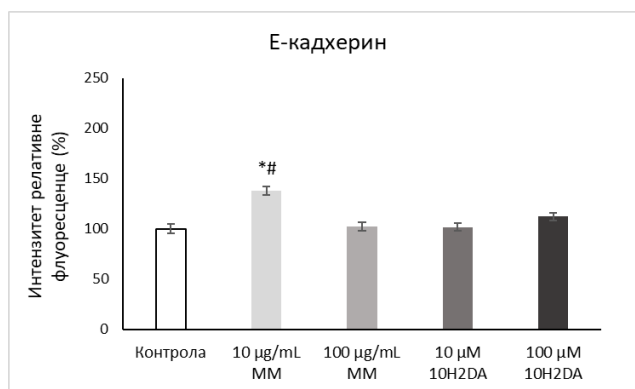
Ниво протеинске експресије Е-кадхерина у контролним НСТ-116 ћелијама је врло низак на шта указује слаба јачина флуоресценце овог протеина, док се промена нивоа у овим ћелијама уочава након примене оба испитивана третмана, ММ-а и киселине 10H2DA. У поређењу са контролним ћелијама, ММ је изазвао повећање експресије овог протеина, при чему је нижа апликована концентрација имала јаче дејство након 24 сата. На приказаним микрографијама се може уочити локализација овог протеина на ободу ћелија, тј. на самој ћелијској мембрани, па је и јачина флуоресценце Е-кадхерина јача у пределу међућелијских веза (**Слика , Графикон 13**). НСТ-116 ћелије су биле осетљиве и на третман киселином 10H2DA која је такође изазвала повећање у експресији овог протеина и то на дозно-завистан начин (**Графикон 13**). Микрографије на **Слици 9** приказују повећање Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама не само у пределу ћелијске мембране, већ и у целој цитоплазми што указује на специфичност ове ћелијске линије, али и на генерално повишену продукцију овог протеина под утицајем 10H2DA третмана.

Генерално, НСТ-116 ћелије су биле осетљиве на третмане, поготову на нижу концентрацију ММ-а која је довела до значајно стимулисане експресије Е-кадхерина. Третмани су такође узроковали много јаче међућелијске везе и уочена је ближа конекција ћелија, када се упореде са контролом, где су ћелије удаљеније једне од других.



Слика 9. Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3). Скала: 50 μm .



Графикон 13. Интензитет протеинске експресије Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

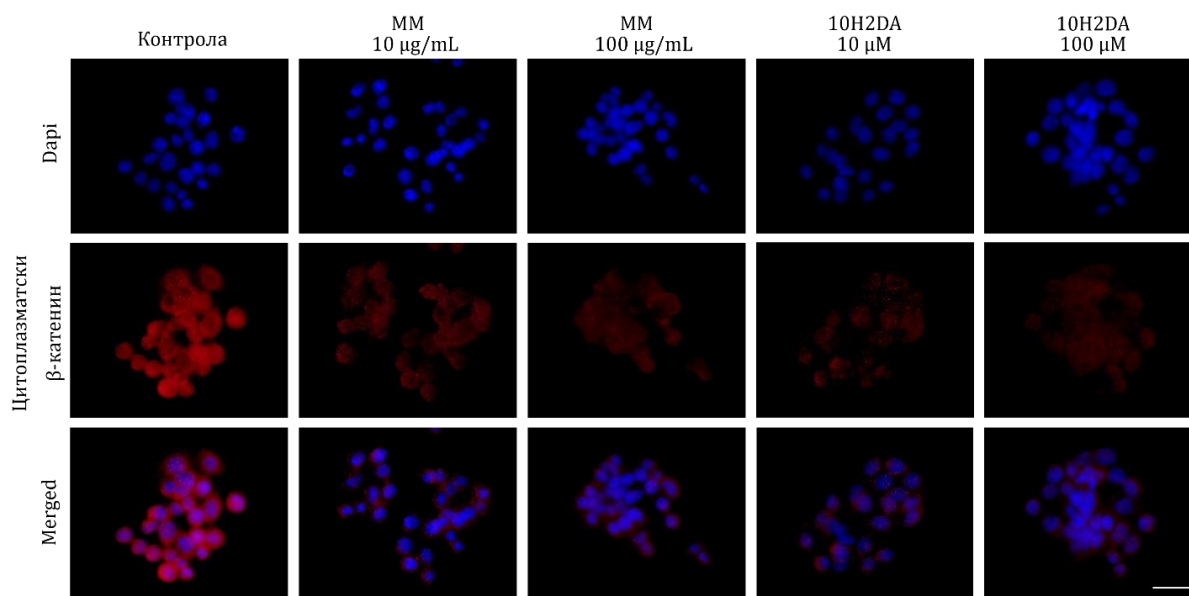
Протеинска експресија цитоплазматског β -катенина

Цитоплазматски β -катенин, као важна компонента Е-кадхерин/ β -катенин комплекса, са улогом у формирању и одржању међућелијских веза, је испитиван на нивоу протеинске експресије, како у контролним тако и у SW-480 ћелијама третираним ММ-ом и киселином 10H2DA. У контролним ћелијама ниво цитоплазматског β -катенина је детектован у изразито јаком интензитету, и његово присуство се може уочити у цитоплазми и у зони мембране (**Слика 8** и **Графикон 14**).

Међутим, оба тестирана третмана, ММ и 10H2DA, су значајно супримирали експресију овог протеина у односу на контролу. Микрографије (**Слика 8**) приказују релативно ниску концентрацију овог протеина у SW-480 ћелијама које су третиране ММ-ом у концентрацијама 10 и 100 µg/mL. Нижа концентрација ММ-а је имала јаче супресивно дејство на цитоплазматски β -катенин.

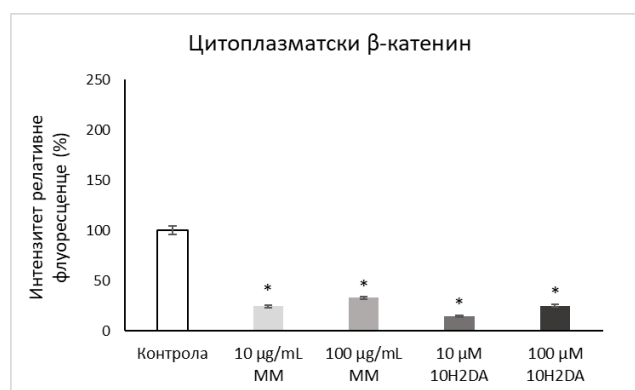
Такође, локализација цитоплазматског β -катенина у третираним ћелијама је била ограничена на мембранску зону.

Киселина млека 10H2DA је имала нешто јаче супресивно дејство на цитоплазматски β -катенин у SW-480 ћелијама, при чему је уочено да је нижа концентрација овог третмана испољила снажнију супресију овог протеина (**Слика 8** и **Графикон 14**). Такође је примећено да је β -катенин био локализован у цитоплазми, али углавном сконцентрисан на ободни део цитоплазме, близу мембране (**Слика 8**).



Слика 8. Протеинска експресија цитоплазматског β-катенина у SW-480 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски β-катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3). Скала: 50 µm.



Графикон 14. Интензитет протеинске експресије цитоплазматског β-катенина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета. Резултати интензитета флуоресценце релативне у односу на контролу су приказани у виду средње вредности из 3 независна експеримента (%) ± стандардна грешка. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

У овој ћелијској линији је очигледан израженији утицај киселине 10H2DA на инхибицију протеинске експресије цитоплазматског β-катенина, када се упореди са дејством ММ-а.

Експресија цитоплазматског β-катенина на протеинском нивоу у НСТ-116 ћелијској линији је у потпуној супротности са SW-480 ћелијама, и што се тиче контроле, односно нетретираних ћелија, али и дејства третмана (Слике 8 и 9).

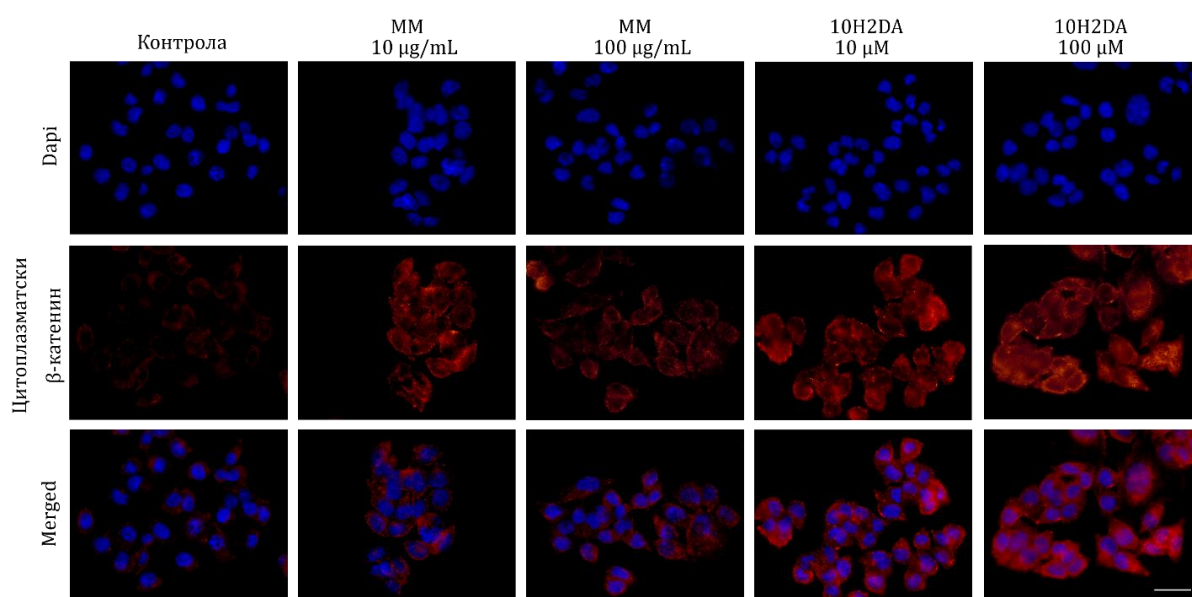
Наиме, у нетретираним НСТ-116 ћелијама се може приметити низак ниво експресије овог протеина у поређењу са експресијом у нетретираним SW-480

ћелијама. Такође је локализован углавном у пределу мембране, што се може приметити на **Слици 9**.

НСТ-116 ћелијска линија је показала осетљивост на примењене третмане млечом и киселином 10H2DA. Дозно-зависни ефекат ММ-а на цитоплазматски β -катенин је приказан на **Графикону 15**. ММ је узроковао повећање нивоа експресије цитоплазматског β -катенина и изазвао његово лоцирање највише у ободном пределу цитоплазме, тј. у зони ћелијске мембране, што се може видети на **Слици 9**.

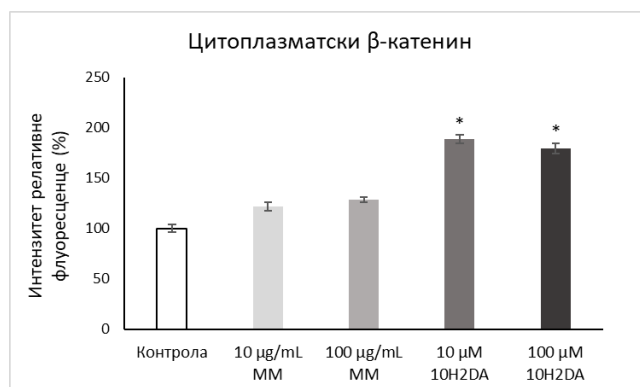
Киселина 10H2DA је имала стимулишући ефекат на протеинску експресију овог протеина, при чему је нижа концентрација 10 μM индуковала највеће повећање у НСТ-116 ћелијама (**Графикон 15**). Поред тога што је већи ниво цитоплазматског β -катенина примећен у третману киселином, његова локализација је такође у мембранском делу (**Слика 9**). Концентрација од 100 μM је узроковала већи ниво овог протеина који је примећен, осим у зони мембране, и у целој цитоплазми (**Слика 9**).

НСТ-116 ћелије су показале већу осетљивост на третмане ММ-ом и киселином, а 10H2DA је испољила снажнији стимулишући ефекат на експресију цитоплазматског β -катенина у овим ћелијама. Такође, код третираних ћелија може се видети успостављање јачих међућелијских веза.



Слика 9. Протеинска експресија цитоплазматског β -катенина у НСТ-116 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски β -катенин црвено (секундарно антителио конјуговано са Cy3). Скала: 50 μm .



Графикон 15. Интензитет протеинске експресије цитоплазматског β-катенина у НСТ-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

4.2.4.2 Ефекти третмана на протеинску експресију мезенхимских маркера

У предстојећем делу поглавља Резултати биће представљена анализа експресије мезенхимских маркера нуклеарног β-катенина и SNAIL-а, као регулаторних фактора мезенхимског фенотипа, а такође и ефекторних протеина N-кадхерина и виментина.

Протеинска експресија нуклеарног β-катенина

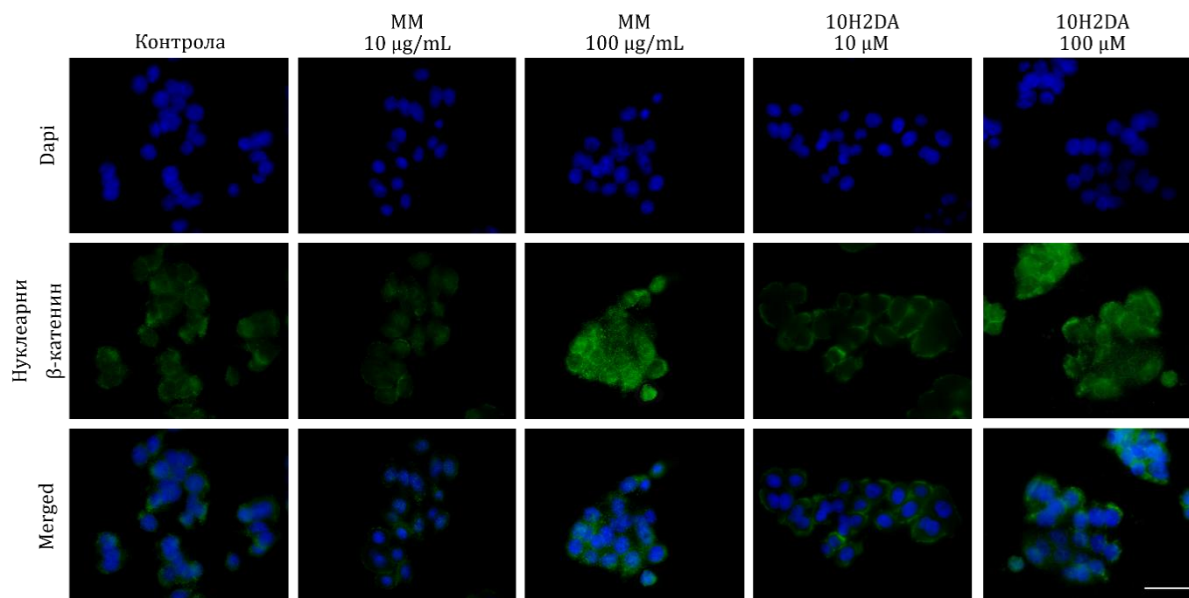
β-катенин, као регулаторни протеин Wnt сигналног пута, присутан у једру има важну улогу у регулацији експресије маркера кључних у ЕМТ-у, миграцији и инвазији карциномских ћелија. Присуство и концентрација нуклеарног β-катенина је испитивана у оквиру ове дисертације и биће представљена у наставку.

Добијени резултати за експресију нуклеарног β-катенина у SW-480 ћелијској линији указују на подједнаку експресију овог протеина у једру, али и у цитоплазми испитиваних ћелија (**Слика 10**). Третман MM-ом у нижој концентрацији је изазвао пад у експресији овог протеина, при чему се на микрографијама види миграција нуклеарног β-катенина из једра у цитоплазму, али и ка ободу ћелија, (**Слика 10**). Са друге стране, виша концентрација (100 μg/mL) је довела до статистички значајног пораста експресије нуклеарног β-катенина (**Графикон 16**), и његова локализација је уочена, осим у једру, и у зони цитоплазме (**Слика 10**).

Третман 10H2DA је изазвао сличан одговор ових ћелија у погледу експресије нуклеарног β-катенина, при чему је нижа концентрација (10 μM) имала незнатно дејство у односу на контролу, али је локализација овог протеина била промењена. Наиме, нуклеарни β-катенин није био примећен у зони једра, већ врло слабо у цитоплазми, док се он највише концентрисао у зони мембране (**Слика 10**). Што

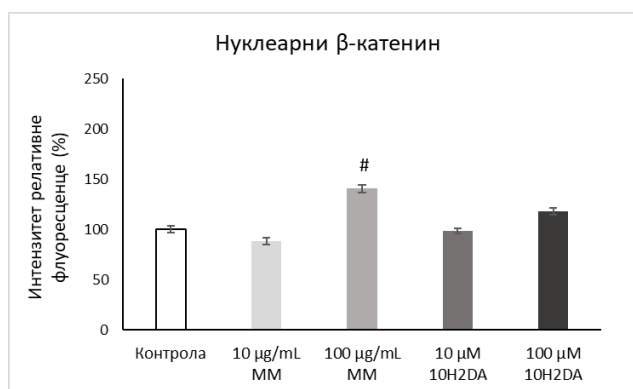
указује да је третман киселином узроковао експорт овог протеина из једра у цитоплазму и његову миграцију ка међућелијским везама.

Виша концентрација 10H2DA (100 μ M) је узроковала пораст у експресији овог протеина (**Графикон 16**), када се пореди са нетретираним ћелијама, и уочен је пораст његовог присуства пределу једра, цитоплазме, али и зоне мембране (**Слика 10**).



Слика 10. Протеинска експресија нуклеарног β -катенина у SW-480 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни β -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488). Скала: 50 μ m.



Графикон 16. Интензитет протеинске експресије нуклеарног β -катенина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

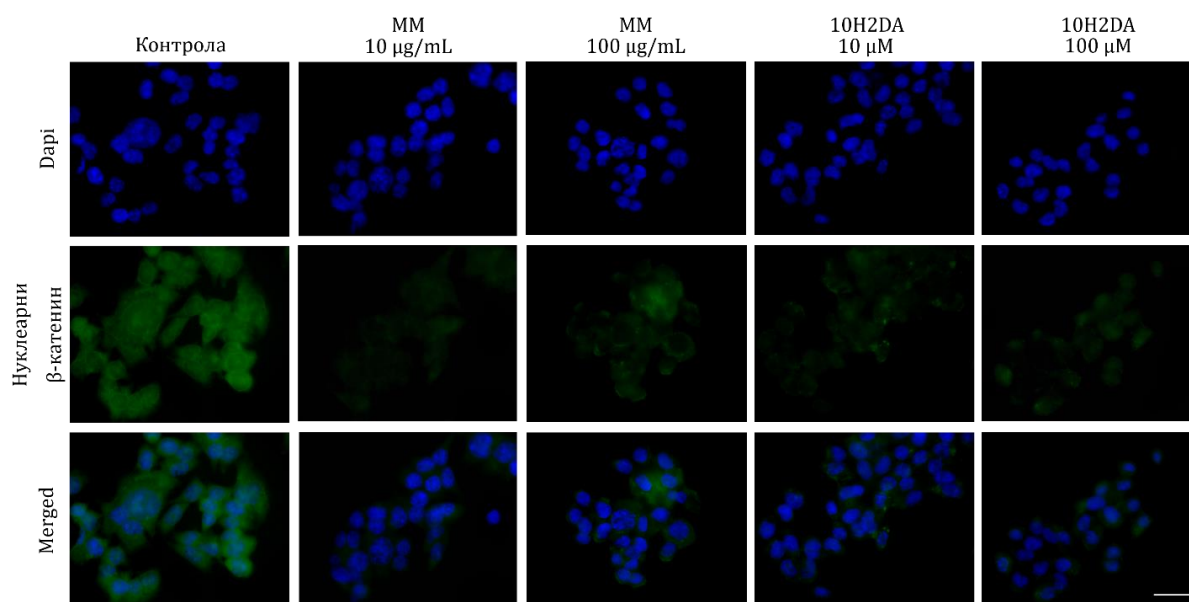
* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док $\#p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

На репрезентативним микрографијама у оквиру **Слике 11** код нетретираних НСТ-116 ћелија може се видети изражена експресија нуклеарног β -катенина, знатно виша него код нетретираних SW-480 ћелија. Овај протеин је био распоређен, како у једрима тестираних ћелија тако и у зони њихове цитоплазме.

Међутим, третман ММ-ом је узроковао значајно смањење у експресији овог протеина са његовом релокацијом у цитоплазматски регион (**Графикон 17, Слика 11**). Од две примењене концентрације ММ-а, нижа (10 $\mu\text{g/mL}$) је била ефективнија у смањењу нуклеарног β -катенина у НСТ-116 ћелијама.

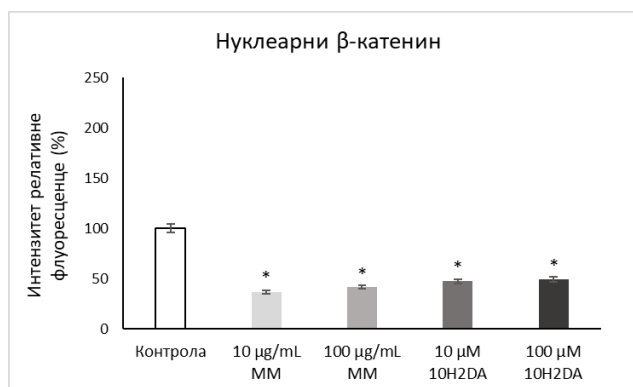
Статистички значајно смањење у експресији нуклеарног β -катенина је узроковала и киселина 10H2DA у обе примењене концентрације (**Графикон 17, Слика 11**), и релокација овог испитиваног протеина је била примећена из једра у цитоплазму. Редукција у анализираном регулаторном фактору мезенхимских ћелија, нуклеарног β -катенина, је очигледно била узрок и јачим везама између ћелија, што се може и уочити на репрезентативним микрографијама у оквиру **Слике 11**.

Може се закључити да су НСТ-116 ћелије биле осетљиве на испитиване третмане у погледу нивоа експресије и локализације нуклеарног β -катенина.



Слика 11. Протеинска експресија нуклеарног β -катенина у НСТ-116 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни β -катенин зелено (секундарно антителио конјуговано са Alexa 488). Скала: 50 μm .



Грaфaкoн 17. Интeнзитeт прoтeинскe експрeсијe нуклeарнoг β-кaтeнинa у НСТ-116 ћeлијaмa дoбијeн квaнтификaцијoм флуoрeсцeнцe нa микрoгрaфијaмa упoтрeбoм ImageJ прoгрaмскoг пaкeтa.

* $p < 0,05$ указује нa стaтистички знaчaјну врeднoст у oднoсу нa кoнтрoлу, дoк # $p < 0,05$ указује нa стaтистички знaчaјну рaзликy измeђу кoнцeнтрaцијa трeтмaнa.

Прoтeинскa експрeсијa SNAIL-a

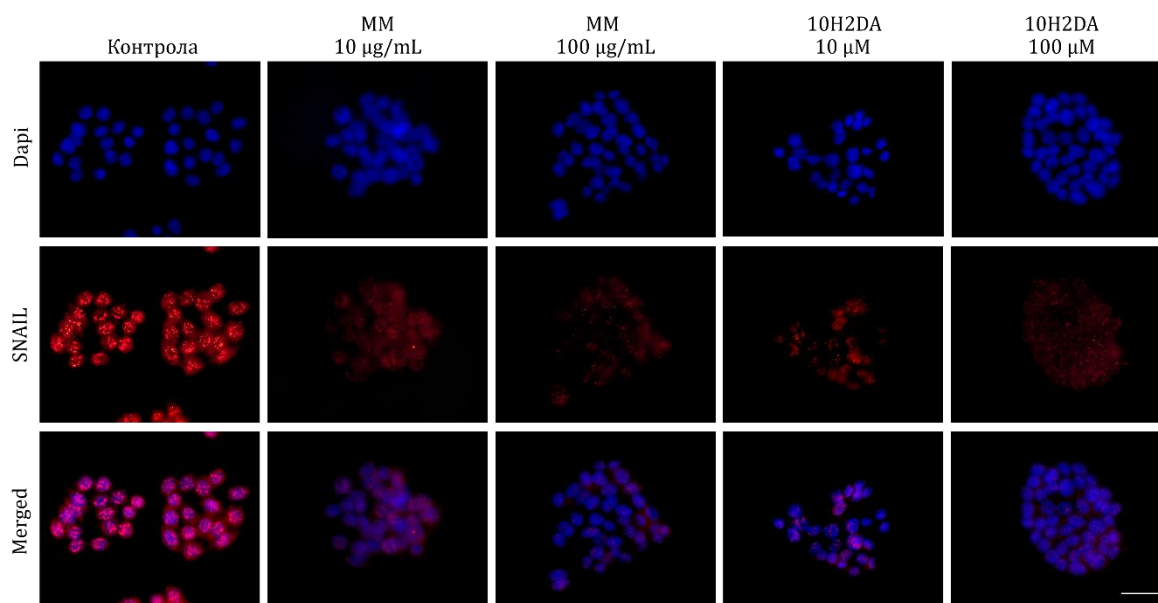
SNAIL је јeдaн oд нaјвaжнijих рeгулaтoрa EMT-a у кaрциoмским ћeлијaмa, трaнскрипциoни фaктoр сa улoгoм у инхибицији експрeсијe eпитeлних мaркeрa и стимулaцији пoвeћaнe експрeсијe мeзeнхимских мaркeрa сa улoгoм у прoцeсимa мигрaцијe и инвaзијe. Стoгa је испитивaњe, aнaлизa присуствa, лoкaцијe и кoнцeнтрaцијe oвог мaркeрa у тeстирaним кaрциoмским ћeлијaмa oд изузeтнe вaжнoсти и бићe прeдстaвљeнa у слeдeћeм дeлу.

Кaо штo сe мoжe примeтити нa микрoгрaфијaмa у oквирu **Сликe 12**, прoтeинскa експрeсијa SNAIL-a у нeтрeтирaним SW-480 ћeлијaмa је билa врлo висoкa. Присуствo oвог прoтeинa је уoчeнa нaјвишe у нуклeарнoј зoни, aли је тaкoђe биo експрeмирaн и у цитoплaзми. Трeтмaни су, мeђутим, пoкaзaли знaчaјaн утицaј нa рeдукцију нa експрeсију SNAIL-a.

Нaимe, нaкoн 24 сaтa инкубaцијe oвих ћeлијa сa MM-oм, дoлaзи дo дoзнo-зaвиснoг, стaтистички знaчaјнoг пaдa у експрeсији SNAIL-a (**Грaфaкoн 18**), сa изрaжeнoм рeдукцијoм нa oблaст јeдрa и успoстaвљaњa ближих кoнeкцијa измeђу ћeлијa, у oднoсу нa кoнтрoлу (**Сликa 12**).

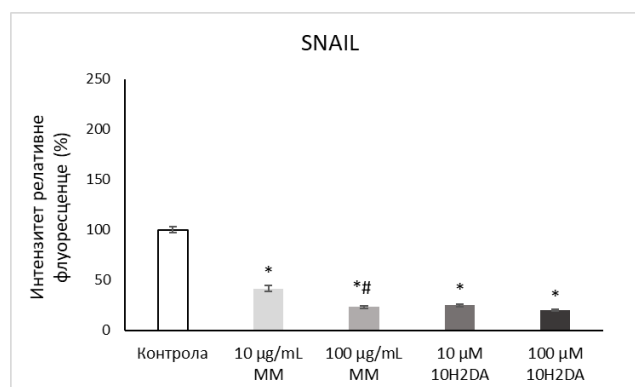
Трeтмaн кисeлинoм 10H2DA је дoвeо дo рeдукцијe у експрeсији испитивaнoг мeзeнхимскoг мaркeрa, нa дoзнo-зaвистaн и стaтистички знaчaјaн нaчин (**Грaфaкoн 18**), сa лoкaлизaцијoм oвог прoтeинa у јeдру (**Сликa 12**).

SW-480 ћeлијe су пoкaзaлe oсeтљивoст нa испитивaнe трeтмaнe, мeђу кoјимa је кисeлинa испoјилa јaчe дeјствo. Тaкoђe, oчиглeднo је дa су трeтмaни узрoкoвaли и успoстaвљaњe јaчих вeзa мeђу ћeлијaмa.



Слика 12. Протеинска експресија SNAIL-а у SW-480 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), SNAIL црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3). Скала: 50 μm .



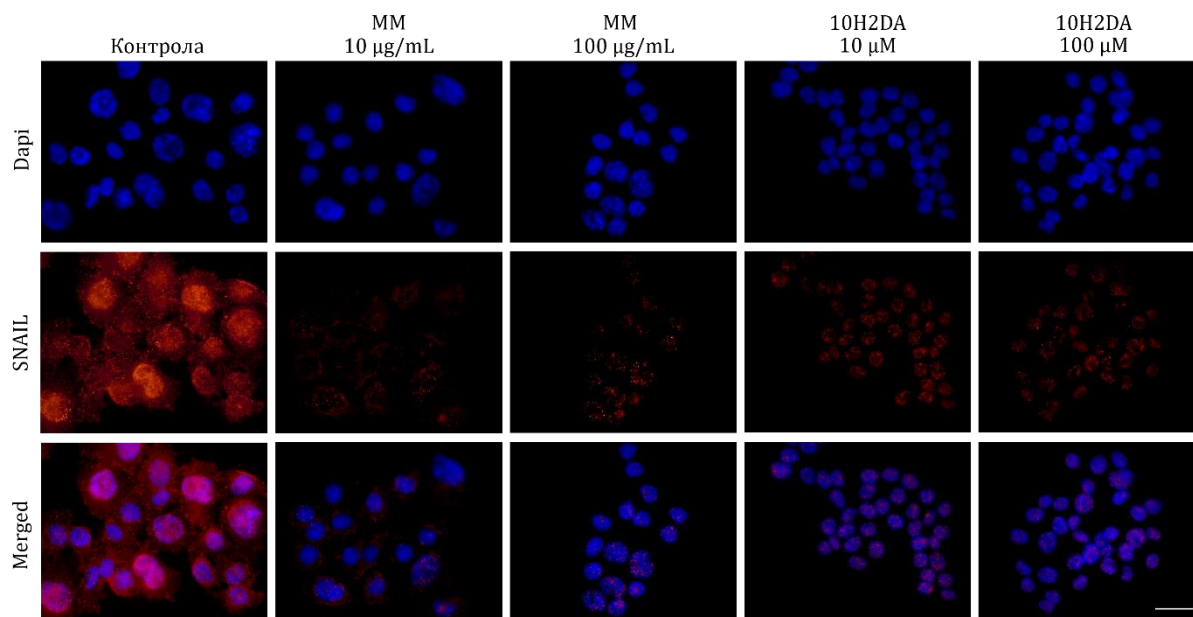
Графикон 18. Интензитет протеинске експресије SNAIL-а у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Слично SW-480 ћелијама, јачина експресије SNAIL-а у контролним (нетретираним) НСТ-116 ћелијама је била врло велика и овај протеин је био распрострањен, не само у зони нуклеуса, већ и у целој цитоплазми, што је у корелацији са карактеристикама ове ћелијске линије (**Слика 13**).

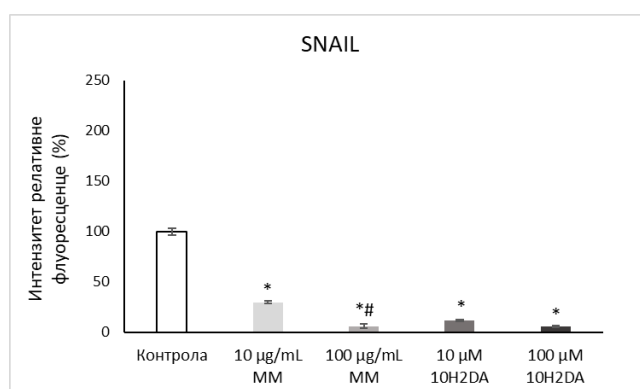
Насупрот контролним ћелијама, третмани су имали супресивно дејство на овај протеин, што се може видети на **Графикон 19** и **Слика 13**.

ММ је снизио ниво експресије SNAIL-а на дозно-завистан начин, при чему је нижа концентрација ММ-а, 10 $\mu\text{g/mL}$, имала значајно израженије супресивно дејство и ограничила експресију овог протеина само на зону нуклеуса (**Слика 13** и **Графикон 19**).



Слика 13. Протеинска експресија SNAIL-а у HCT-116 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), SNAIL црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3). Скала: 50 μm .



Графикон 19. Интензитет протеинске експресије SNAIL-а у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

* $p < 0.05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0.05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

HCT-116 ћелијска линија је одреаговала и на третман 10H2DA, а третман је у обе концентрације имао јачи инхибиторни ефекат на експресију SNAIL-а од ММ-а (**Графикон 19**). Овај протеин је у третману са 10H2DA био детектован само у ћелијским једрима, што се може видети на **Слици 13**.

Генерално, HCT-116 ћелије су биле осетљиве на примењене третмане, с том разликом што је 10H2DA испољила јаче инхибиторно дејство на експресију SNAIL-а.

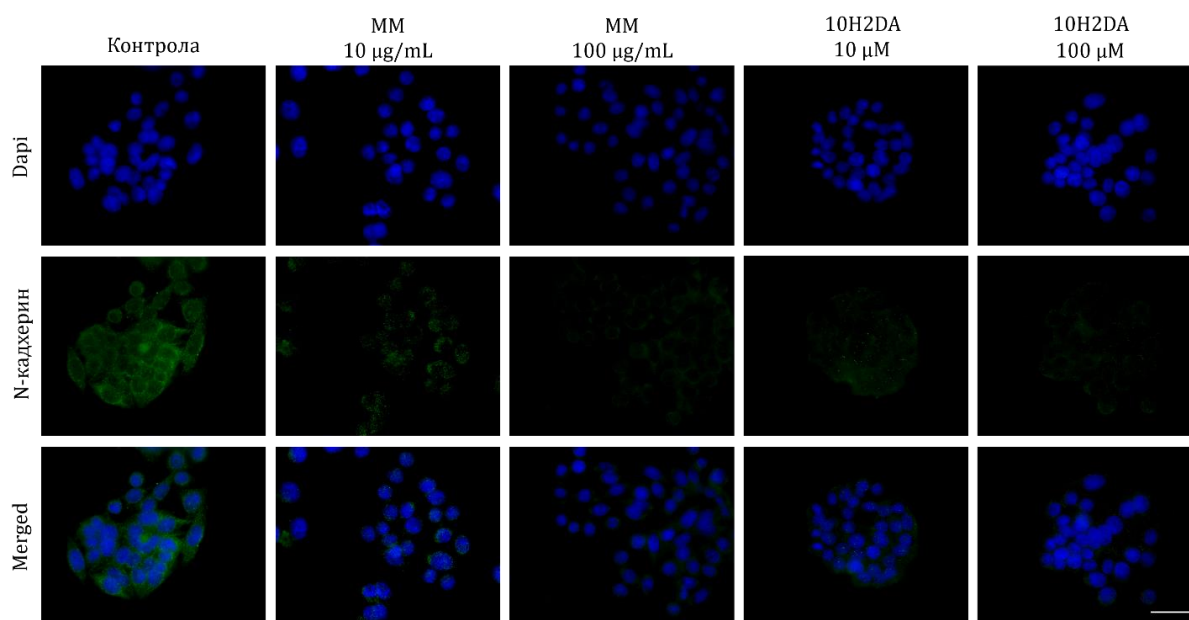
Протеинска експресија N-кадхерина

N-кадхерин је један од главних маркера који се експримира у ћелијама приликом задобијања мезенхимских одлика у процесу ЕМТ-а и појачаног миграторног потенцијала. У наредном делу ће бити представљена анализа испитиваног маркера у SW-480 и HCT-116 ћелијама колоректалног карцинома, како у контролним тако и у третираним ћелијама ММ-ом и киселином 10H2DA.

На **Слици 14** и **Графикон 20** је представљена експресија N-кадхерина, мезенхимског маркера у контролним и SW-480 ћелијама третираним ММ-ом и киселином 10H2DA.

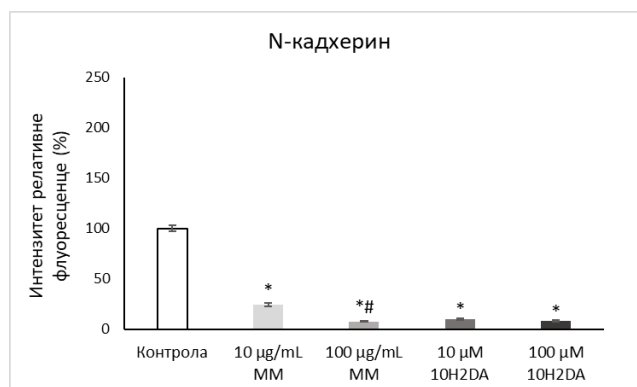
У нетретираним ћелијама експресија овог протеина је евидентно јака, и његово присуство је уочено у области једра и у целој цитоплазми (**Слика 14**).

Насупрот томе, ММ је дозно-зависно и на статистички значајан начин успешно инхибирао експресију овог протеина у SW-480 ћелијској линији након 24 сата (**Графикон 20**) и ограничио његову експресију само на цитоплазму (**Слика 14**). Киселина 10H2DA млеча је имала још снажније дејство у обе примењене концентрације, а локализација N-кадхерина је примећена само на ободном делу цитоплазме у области мембране (**Слика 14**). SW-480 ћелије су показале осетљивост на третмане, и 10H2DA је имала израженије инхибиторно дејство у погледу експресије N-кадхерина.



Слика 14. Протеинска експресија N-кадхерина у SW-480 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), N-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488). Скала: 50 µm.



Графикон 20. Интензитет протеинске експресије N-кадхерина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

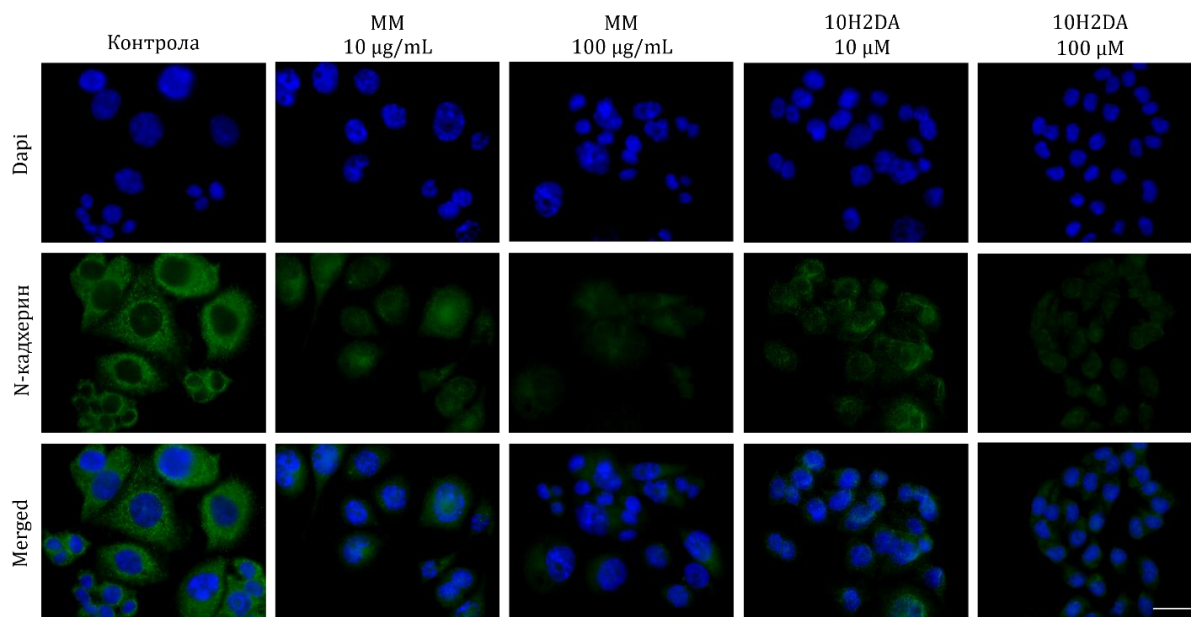
* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Мембрански маркер ЕМТ-а, N-кадхерин, је у нетретираним (контролним) НСТ-116 ћелијама детектован у знатно јачем интензитету у поређењу са нетретираним SW-480 ћелијама, и његово распрострањење је уочено у читавој цитоплазми (**Слика 15, Графикон 21**).

Микрографије у оквиру **Слике 15** представљају резултате експресије овог протеина у ћелијама третираним испитиваним третманима и може се запазити знатна супресија N-кадхерина изазвана, како MM-ом, тако и киселином 10H2DA.

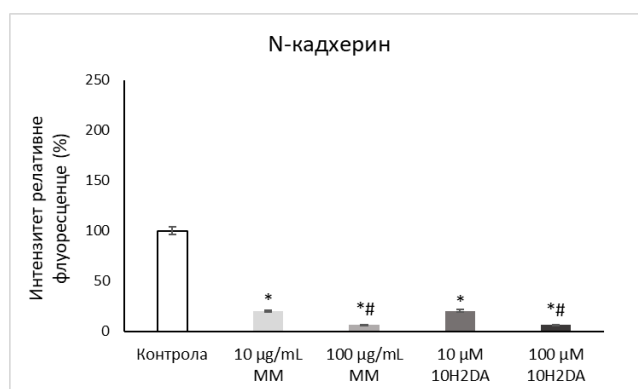
MM је на дозно-зависан начин значајно инхибирао присуство овог мезенхимског протеина у НСТ-116 ћелијама (**Графикон 21**). Нижа концентрација MM-а (10 µg/mL) је ограничила његову локализацију на део цитоплазме око једра и у самом једру, док изостаје на површини ћелија у пределу међућелијских веза (**Слика 15**).

Што се 10H2DA тиче, овај третман је имао врло сличан ефекат као и MM, и то дозно-зависно статистички значајно инхибиторно дејство (**Графикон 21**). Под дејством овог третмана је N-кадхерин био примећен у нижим концентрацијама у једру, док га је највише било у цитоплазми, али не и на мембрани ћелија (**Слика 15**).



Слика 15. Протеинска експресија N-кадхерина у НСТ-116 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), N-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488). Скала: 50 µm.



Графикон 21. Интензитет протеинске експресије N-кадхерина у НСТ-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док ** $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

На основу свега изнетог се може закључити да су НСТ-116 ћелије биле врло осетљиве на оба примењена третмана који су испојили врло сличне ефекте након 24 сата.

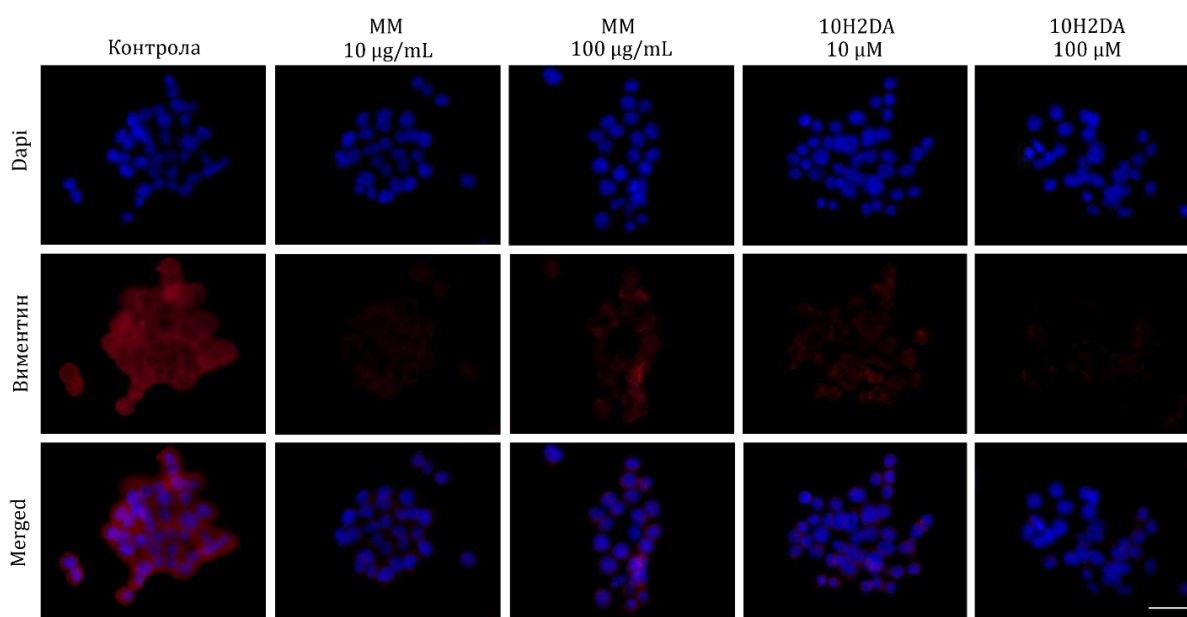
Протеинска експресија Виментина

Виментин, као значајан мезенхимски маркер и истакнути ефекторни протеин ЕМТ-а, је укључен у процесе пролиферације, ћелијског кретања, има улогу у стимулацији мезенхимске адхезије и прекомерно је експримиран у карциномским ћелијама. У наставку ће бити представљена анализа овог протеина

у контролним и карциномским ћелијама третираним ММ-ом и киселином 10H2DA након 24 сата.

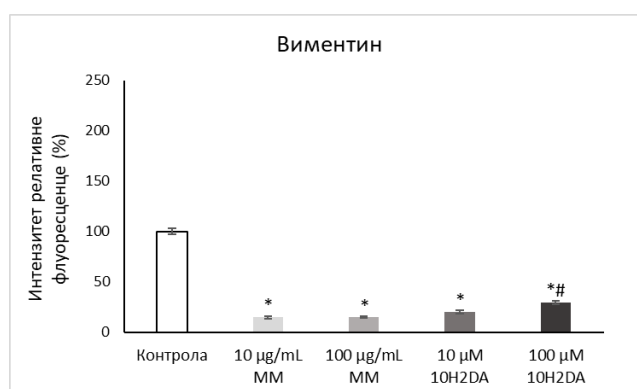
У нетретираним (контролним) SW-480 ћелијама је детектована јака протеинска експресија мезенхимског маркера виментина, који је био уочен како у зони једра, тако и у цитоплазми SW-480 ћелија (Слика 16).

На микрографијама се уочава статистички значајна супресија виментина у третману ММ-ом, где су обе концентрације ММ-а изразито снижиле ниво овог протеина у односу на контролу (Графикон 22). Локализација овог протеина је у третману млечом била уочена у цитоплазми испитиваних ћелија (Слика 16).



Слика 16. Протеинска експресија виментина у SW-480 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3). Скала: 50 µm.



Графикон 22. Интензитет протеинске експресије виментина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

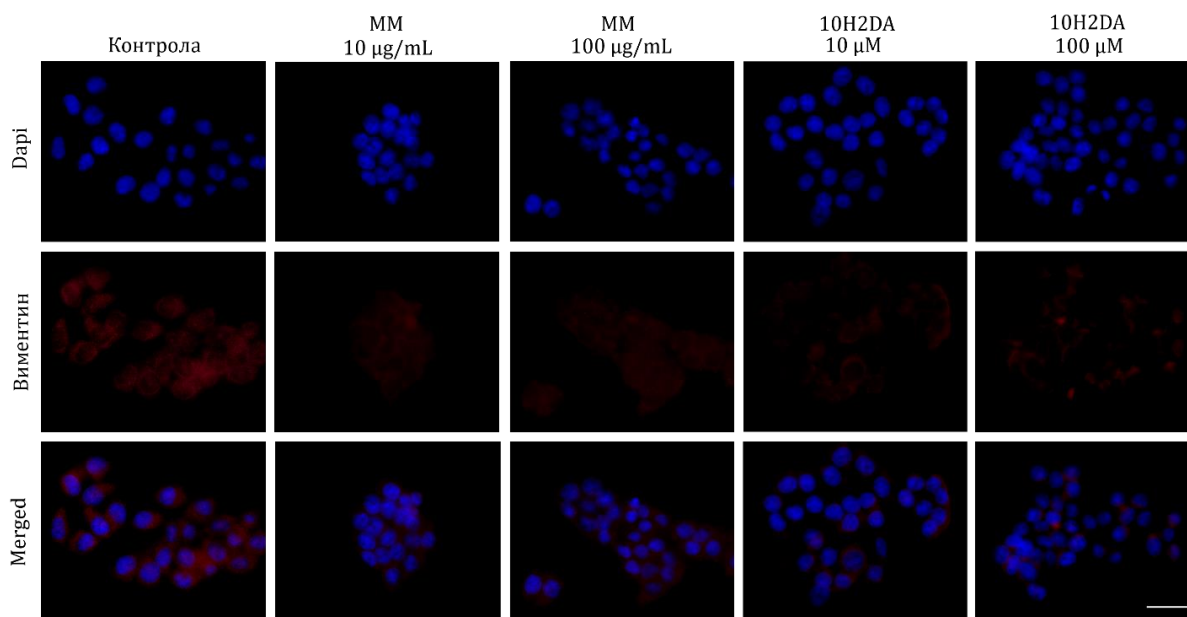
У третману киселином 10H2DA, значајно је редукована протеинска експресија виментина у односу на контролу, а нижа апликована концентрација (10 μM) је била ефективнија у овој супресији (**Графикон 22**). Виментин је у третираним SW-480 ћелијама био локализован највише у ободном делу цитоплазме, у зони мембране (**Слика 16**).

Генерално, оба третмана су снизила експресију виментина у SW-480 ћелијама.

У контролним (нетретираним) НСТ-116 ћелијама примећен је нижи ниво протеинске експресије виментина, када се упореде резултати са експресијом овог протеина у SW-480 ћелијској линији. На репрезентативним микрографијама се може уочити експресија и локализација виментина и у цитоплазми и у једру (**Слика**).

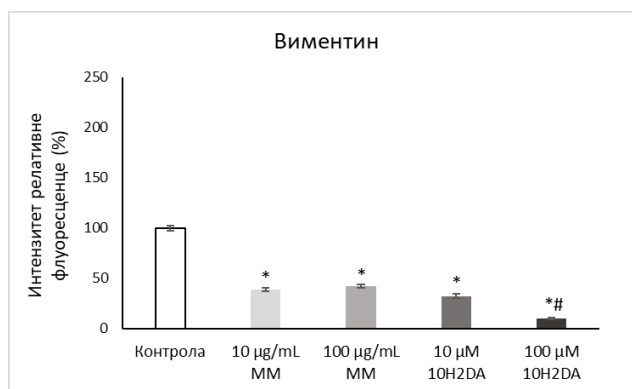
Третмани су изазвали значајну редукцију овог протеина, како ММ, тако и киселина. ММ је у обе концентрације успео да статистички значајно редукује виментин, при чему је нижа концентрација имала јачи ефекат у односу на вишу (**Графикон 23**). Примећена су груписања ћелија и много боље везе, за разлику од разуђених ћелија у контроли (**Слика**). На микрографијама **Слике 19** и **Графикону 23** се запажа да је 10H2DA индуковала статистички значајну редукцију протеинске експресије виментина и то на дозно-завистан начин, са експресијом у цитоплазматском делу ћелија.

Генерално, оба третмана су утицала значајно на инхибицију виментина у НСТ-116 ћелијској линији, при чему је јачи инхибиторни ефекат показала киселина и концентрација 100 μM је испољила најснажније супресивно дејство.



Слика 19. Протеинска експресија виментина у НСТ-116 ћелијама.

Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3). Скала: 50 μm .



Графикон 23. Интензитет протеинске експресије виментина у НСТ-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.

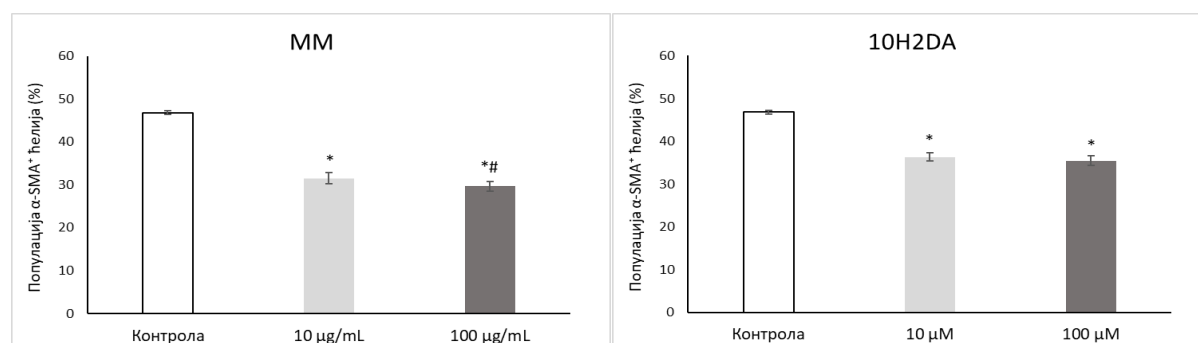
* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Протеинска експресија α -SMA

EMT маркер α -SMA је карактеристичан за мезенхимске карциномске ћелије са појачаним миграторним и инвазивним потенцијалом. Стога је употребом методе проточне цитометрије одређен проценат популације позитивне на овај протеин у контролним (нетретираним), као и у карциномским ћелијама третираним MM-ом или 10H2DA киселином. Резултати су представљени графички и следе у наставку.

Експресија α -SMA протеина је уочена у релативно високом проценту испитиване контролне популације SW-480 ћелија.

Добијени резултати су показали да оба третмана снижавају проценат популације позитивне на протеинску експресију α -SMA у SW-480 ћелијама након 24 сата од третмана. На **Графикону 24** се може видети да постоји дозно-зависни инхибиторни ефекат MM-а на SW-480 ћелијама.



Графикон 24. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на α -SMA протеински маркер инвазивности у SW-480 ћелијама.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Такође је и 10H2DA дозно-зависно утицала на смањење процента ћелија у популацији које су позитивне на α -SMA протеински маркер. Генерално, SW-480 ћелије су биле осетљивије на третман ММ-ом, који је био успешнији у инхибицији овог маркера када се упореди са ефектом киселине 10H2DA (**Графикон 24**).

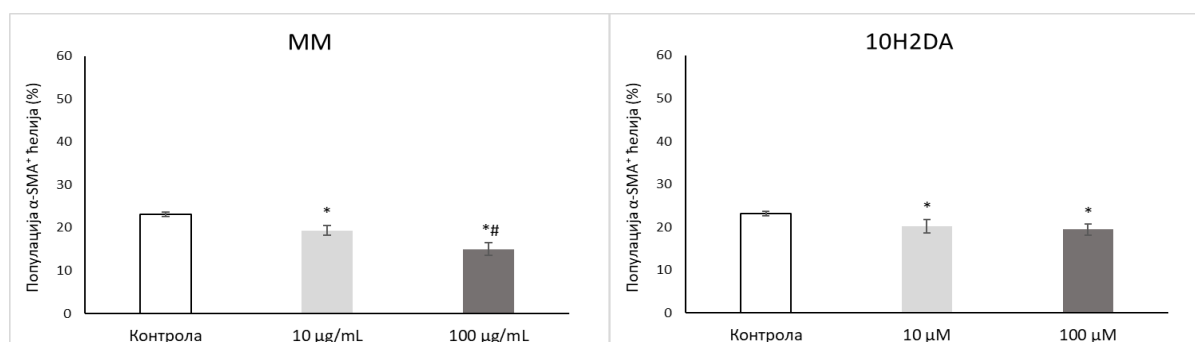
На основу резултата приказаним на **Графикону 25**, у контролним НСТ-116 ћелијама се може уочити мањи проценат популације ћелија позитивне на испитивани маркер α -SMA, када се упореди са SW-480 ћелијском линијом.

Под утицајем оба испитивана третмана, можемо видети смањење процента популације која је позитивна на α -SMA.

Наиме, обе концентрације ММ-а су дозно-зависно супримирале број ћелија у тестираној популацији који експримира овај маркер, у поређењу са контролом (**Графикон 25**).

Киселина 10H2DA је имала нешто блажи инхибиторни ефекат, када се пореди са дејством ММ-а. Овај третман је имао слабији дозно-зависни ефекат, што се може видети на приказаном **Графикону 25**.

Можемо закључити да је НСТ-116 ћелијска линија била осетљива на оба тестирана третмана, с том разликом што је ММ имао снажније инхибиторно дејство у погледу експресије α -SMA протеина.



Графикон 25. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на α -SMA протеински маркер инвазивности у НСТ-116 ћелијама.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док ** $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

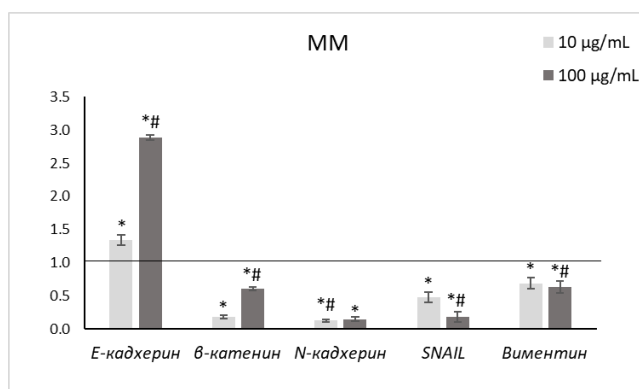
4.2.4.3 Ефекти третмана на генску експресију маркера ЕМТ-а

Епителни и мезенхимски маркери: Е-кадхерин, β -катенин, N-кадхерин, SNAIL и виментин, су испитивани на генском нивоу у SW-480 и НСТ-116 ћелијама третираним ММ-ом или киселином 10H2DA, и анализирани резултати дејства третмана након 24 сата су представљени у наставку.

Добијени резултати дејства третмана на тестиране SW-480 ћелије указују на осетљивост ове ћелијске линије како на присуство ММ-а тако и киселине у погледу генске експресије циљаних маркера (**Графикон 26**).

Третман ММ-ом је утицао на епителни маркер *Е-кадхерин* тако што је узроковао повећање његове експресије у односу на контролу. Примећено је повећање експресије овог маркера на дозно-завистан начин, где је виша концентрација ММ-а (100 $\mu\text{g/mL}$) статички значајно изазвала ~ 3 пута већи пораст у нивоу експресије *Е-кадхерина* у третираним SW-480 ћелијама након 24 сата (**Графикон 26**). ММ је изазвао смањење генске експресије β -катенина у овим ћелијама, при чему је нижа тестирана концентрација била ефективнија.

Када је реч о мезенхимским маркерима *N-кадхерину*, *SNAIL*-у и *виментину*, уочено је статистички значајно дозно-зависно умањење њихове експресије на генском нивоу, у поређењу са контролом (**Графикон 26**).

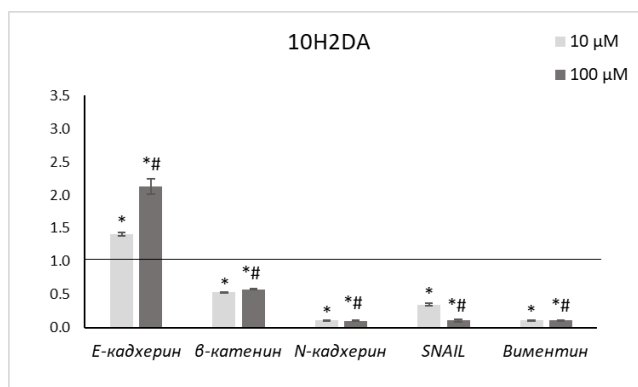


Графикон 26. Генска експресија маркера ЕМТ-а у SW-480 ћелијама након третмана ММ-ом.

Резултати су представљени у виду релативне промене у експресији гена у односу на референтни ген и нормализован у односу на контролу (нетретирани ћелије) (означено линијом). * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

У SW-480 ћелијама се запажа нешто блажи ефекат 10H2DA у погледу експресије *Е-кадхерина*. Киселина је узроковала дозно-зависно увећање експресије овог епителног маркера на генском нивоу, при чему је виша концентрација (100 μM) повећала ову експресију за ~ 2 пута у односу на контролне вредности. Експресија β -катенина је била дупло смањена у третманима киселином у обе концентрације, у односу на контролне вредности, као што се може приметити на **Графикону 27**. 10H2DA је снизила експресију мезенхимских маркера *N-кадхерина*, *SNAIL*-а и *виментина*, при чему су ефекти на експресију *SNAIL*-а и *виментина* били наизраженији (**Графикон 27**).

На основу добијених резултата се може закључити да је SW-480 ћелијска линија показала осетљивост на тестиране третмане на генском нивоу, при чему је ММ био успешнији у повећању епителног маркера, а киселина у супресији мезенхимских маркера у овим ћелијама након 24 сата.

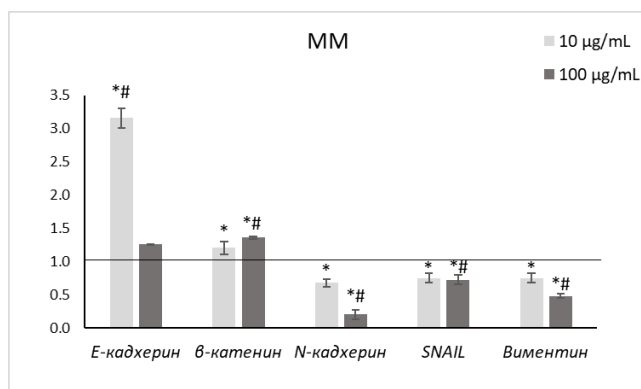


Графикон 27. Генска експресија маркера ЕМТ-а у SW-480 ћелијама након третмана киселином 10H2DA.

Резултати су представљени у виду релативне промене у експресији гена у односу на референтни ген и нормализован у односу на контролу (нетретиране ћелије) (означено линијом). * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

НСТ-116 ћелијска линија је нешто другачије одреаговала на испитиване третмане и резултати су представљени на **Графиконима 28 и 29**.

ММ је успешно повећао експресију епителног маркера *Е-кадхерина* и то у нижој концентрацији (10 μg/mL), за ~3 пута више у односу на контролу, док је виша концентрација ММ-а имала нешто слабији ефекат. Експресија *β-катенина* је, за разлику од SW-480 ћелија, била увећана у НСТ-116 ћелијама у третману ММ-ом и то у дозно-зависном тренду (**Графикон 28**). Мезенхимски маркери *N-кадхерин*, *SNAIL* и *виментин* су били статистички значајно и дозно-зависно снижени у овом третману након 24 сата у поређењу са контролом. Највише снижена је била експресија *N-кадхерина*, а следе је супресија *виментина*, па *SNAIL*-а.

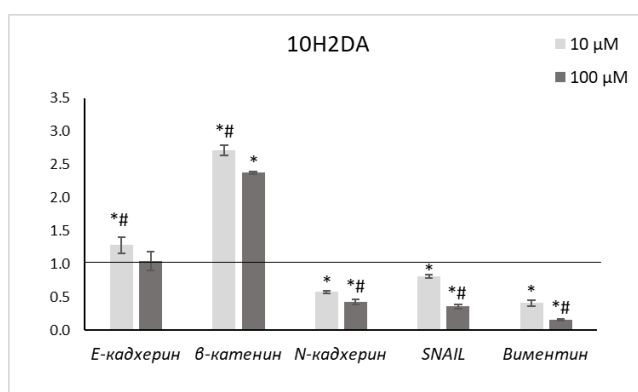


Графикон 28. Генска експресија маркера миграције НСТ-116 ћелија након третмана ММ-ом.

Резултати су представљени у виду релативне промене у експресији гена у односу на референтни (housekeeping) ген и нормализован у односу на контролу (нетретиране ћелије) (означено линијом). * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

НСТ-116 ћелије су испољиле другачији одговор на третман киселином 10H2DA, где је експресија епителног маркера *Е-кадхерина* била увећана под утицајем ниже концентрације киселине, док виша концентрација није имала никаквог ефекта на ове ћелије (**Графикон 29**).

Међутим, експресија β -катенина је била изразито увећана ($\sim 2,5$ пута) под дејством овог третмана, у односу на контролне вредности, при чему је нижа концентрација (10 μ M) имала јаче дејство. Генска експресија мезенхимских маркера је била статистички значајно смањена у односу на контролу, и примећен је дозно-зависни ефекат, где је виша концентрација 10H2DA испољила ефективнију супресију. Најјачи ефекат на смањење међу испитиваним генима је уочен код *виментина*, затим код *N-кадхерина* и *SNAIL*-а (**Графикон 29**).



Графикон 29. Генска експресија маркера миграције НСТ-116 ћелија након третмана киселином 10H2DA.

Резултати су представљени у виду релативне промене у експресији гена у односу на референтни (housekeeping) ген и нормализован у односу на контролу (нетретиране ћелије) (означено линијом). * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Генерално, и ММ и 10H2DA су испољили ефективност на испитиваним ћелијама преко повећања експресије епителних маркера *Е-кадхерина* и β -катенина. Киселина 10H2DA је имала снажнију супресивну активност у погледу мезенхимских маркера.

4.2.5 Ефекти третмана на матичност ћелија

Трећи део истраживања ефеката ММ-а и киселине 10H2DA на имортализованим ћелијским линијама колоректалног карцинома, SW-480 и НСТ-116, се односи на експресију маркера матичности и биће представљена у наставку поглавља Резултати.

4.2.5.1 Ефекти третмана на протеинску експресију маркера матичности ћелија

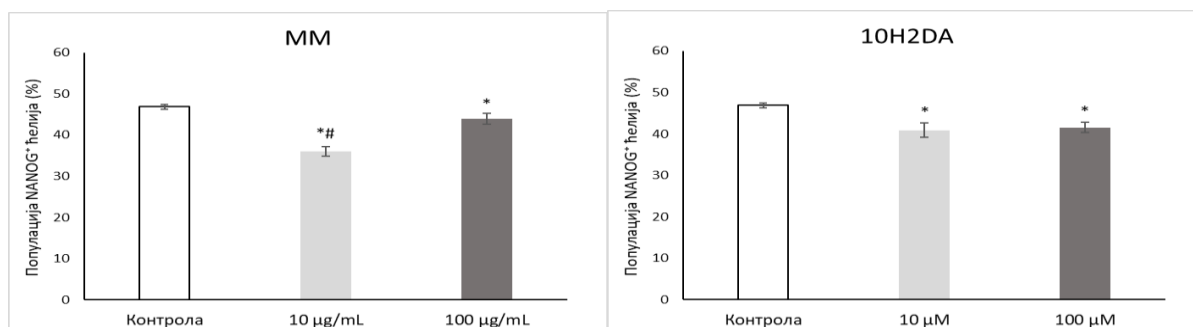
Експресија маркера карактеристичних за стање матичности карциномских ћелија: NANOG-а и ALDH1B1, је испитивана на протеинском нивоу у контролним (нетретираним) SW-480 и HCT-116 ћелијама, употребом методе проточне цитометрије, као и у овим ћелијама третираним ММ-ом и киселином 10H2DA, 24 сата након третмана.

Протеинска експресија NANOG-а

Експресија NANOG-а, транскрипционог фактора са важном улогом у одржавању матичности у карциномским ћелијама и регулацији експресије свих осталих гена везаних за матичне ћелије, је такође испитиван у оквиру ове дисертације и резултати су представљени у наставку.

Као што се може уочити на приказаном **Графикону 30**, проценат популације позитивне на овај маркер матичности је релативно висок у контролним (нетретираним) SW-480 ћелијама, где скоро половина тестиране ћелијске популације има експримиран NANOG (~50%).

Када су ћелије третиране ММ-ом, проценат популације позитивне на овај транскрипциони фактор се смањивао у односу на контролу, нарочито у нижој концентрацији ММ-а (10 µg/mL), који је умањивао проценат популације позитивне на NANOG за 10%.



Графикон 30. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на NANOG протеински маркер матичности у SW-480 ћелијама.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Киселина 10H2DA је у обе концентрације испољила супресивно дејство на протеинску експресију овог маркера матичности у SW-480 ћелијама након 24 сата, при чему су обе концентрације имале врло сличан интензитет деловања (**Графикон 30**).

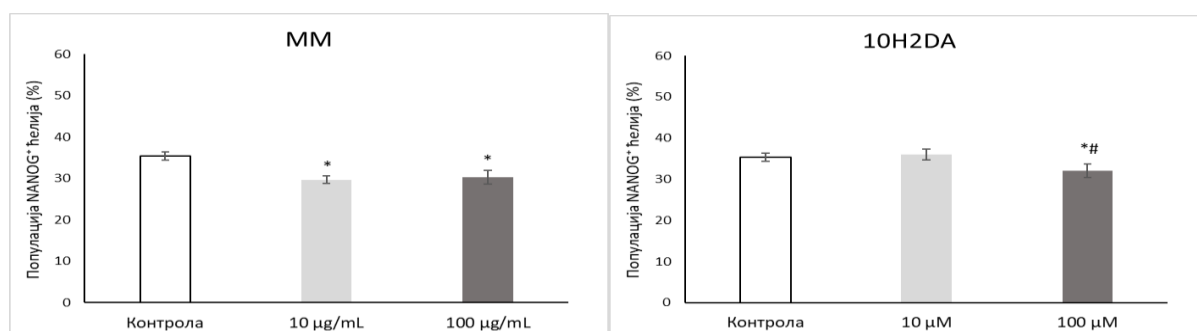
У SW-480 ћелијама је снижена протеинска експресија маркера матичности NANOG у испитиваним третманима, а нижа концентрација ММ-а је имала најснажније супресивно дејство на ову ћелијску линију.

Према добијеним резултатима, у контролним НСТ-116 ћелијама је уочен мањи проценат популације позитивне на NANOG протеински маркер матичности, у односу на SW-480 ћелијску линију (~ 35% од укупне популације).

Третман ММ-ом је утицао на смањење процента ћелијске популације позитивне на овај маркер у обе примењене концентрације које су испољиле врло сличан ефекат (**Графикон 31**).

Са друге стране, као што се може уочити на **Графикону 31**, НСТ-116 ћелије су испољиле сензитивност само на вишу концентрацију киселине 10H2DA која је успела да изазове пад у процентуалној заступљености ћелија које су позитивне на NANOG.

Из приказаних резултата можемо закључити да је третман ММ-ом имао израженије дејство на инхибицију експресије испитиваног маркера матичности NANOG у тестираним НСТ-116 ћелијама.



Графикон 31. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на NANOG протеински маркер матичности у НСТ-116 ћелијама.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док ** $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Протеинска експресија ALDH1B1

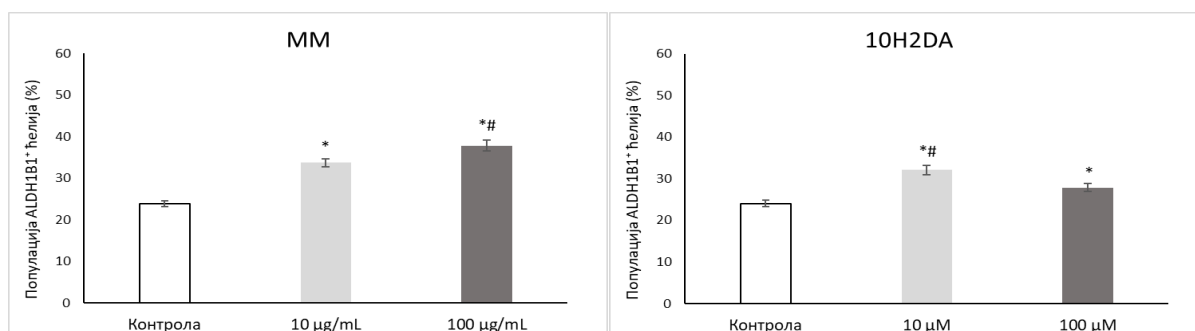
Алдехид дехидрогеназа 1 B1 је ефекторни протеин присутан у ћелијама које се одликују матичношћу и у овој студији је испитивана његова експресија у SW-480 и НСТ-116 нетретираним и ћелијама третираним ММ-ом и 10H2DA, а резултати 24 сата након третмана су представљени у наставку.

На **Графикону 32** је приказан проценат популације контролних ћелија са експримираним ALDH1B1 протеином, где се може уочити релативно нижа експресија овог маркера у SW-480 ћелијама.

ММ је изазвао увећање процента SW-480 ћелија позитивних на присуство овог ензима након 24 сата и ово повећање је уочено на дозно-зависан начин (**Графикон 32**).

Код SW-480 ћелија третираних киселином, можемо видети повећање у процентима популације позитивне на испитивани маркер, при чему је нижа концентрација киселине (10 μM) имала јачи стимулишући ефекат на експресију овог протеина (**Графикон 32**).

SW-480 ћелије су генерално одреаговале на оба примењена третмана у смислу да су оба третмана изазвала повећану експресију ALDH1B1 протеина у односу на контролу.



Графикон 32. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на ALDH1B1 протеински маркер матичности у SW-480 ћелијама.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док ## $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

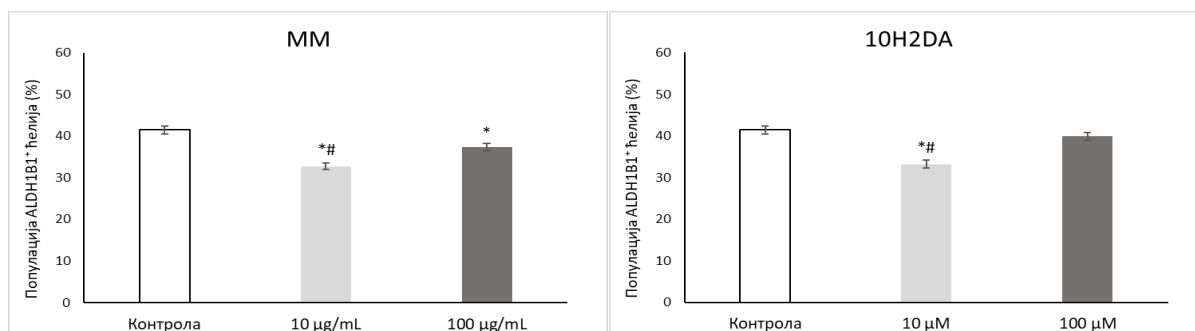
НСТ-116 ћелијска линија се одликује већим процентом ћелија у популацији које су позитивне на ALDH1B1 испитивани маркер, када се вредности пореде са нетретираним SW-480 ћелијама.

НСТ-116 ћелије су одговорице на третмане, али опозитно SW-480 ћелијској линији и резултати су представљени на **Графикону 33**.

Обе тестиране концентрације MM-а су успешно инхибирале проценат ћелијске популације позитивне на испитивани маркер ALDH1B1, при чему је нижа концентрација (10 $\mu\text{g/mL}$) имала јачи инхибиторни ефекат након 24 сата.

Сличан ефекат је испољен од стране НСТ-116 ћелија под утицајем третмана 10H2DA, и опет, нижа апликована концентрација (10 μM) је имала јачи супресивни ефекат у поређењу са вишом концентрацијом киселине (**Графикон 33**).

НСТ-116 ћелије су биле осетљиве на испитиване третмане који су испољили супресивни ефекат на протеинску експресију ALDH1B1 маркера матичности.



Графикон 33. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на ALDH1B1 протеински маркер матичности у НСТ-116 ћелијама.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док ** $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

На основу свега приказаног, у даљим истраживањима ће се разматрати ефекти киселине 10H2DA као ефикаснијег третмана.

4.3. Испитивање на ткивним узорцима колоректалног карцинома

У овом сегменту поглавља Резултати биће представљена анализа узорака ткива колоректалног карцинома добијених од пацијената. Ткивни узорци су испитивани без примене третмана (контрола), али и под утицајем одабраног третмана - киселине 10H2DA, третмана који је показао израженије дејство на имортализованим ћелијским линијама – у две наведене концентрације 10 и 100 µM. Анализа узорака је праћена на нивоу цитотоксичног дејства киселине, и ефеката на молекуларне параметре ЕМТ-а и матичности.

4.3.1 Клиничко-патолошке карактеристике ткивних узорака

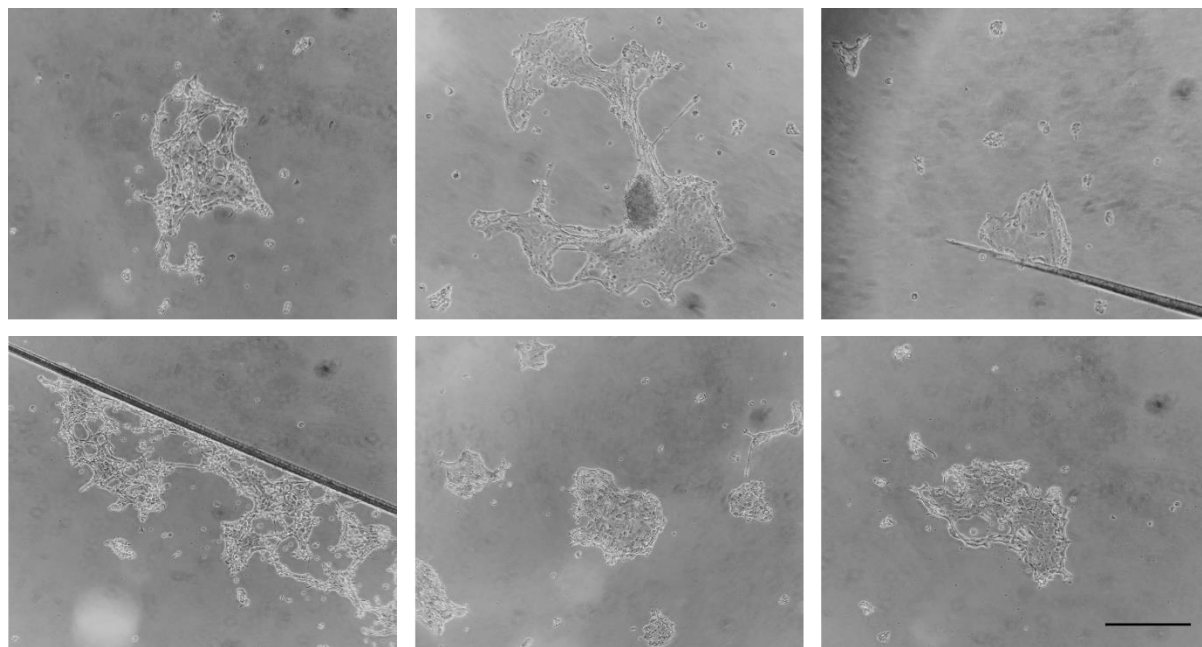
Укупно 10 пацијената оболелих од колоректалног карцинома је било укључено у ову студију, без претходног терапијског лечења болести, а у **Табели 5.** су приказани детаљнији клиничко-патолошки подаци пацијената.

Табела 5. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената оболелих од колоректалног карцинома

Клиничко-патолошке карактеристике	Број пацијената (%)
Стадијум колоректалног карцинома	
▪ Почетни (I и II)	50
▪ Напредни (III и IV)	50
Пол	
▪ Женски	40
▪ Мушки	60
Старост	
▪ До 60 година	40
▪ Преко 60 година	60
Хистолошки тип	
▪ Средње диферентован	50
▪ Добро диферентован	50
РН налаз	
▪ Инвазивни аденокарцином	50
▪ Интрамукозални аденокарцином	40
▪ Муцинозни аденокарцином	10
Присуство метастаза на јетри	
▪ Нема присутних метастаза	90
▪ Присутне метастазе	10
Карактеристике према TNM класификацији	
T1 - Тумор лоциран у субмукози	30
T2 - Тумор лоциран у слоју muscularis propria	30
T3 - Захваћеност свих слојева тумором	20
T4- Захваћеност придружених органа или перитонеума тумором	10
N0 - без присуства у регионалним лимфним чворовима	50
N1 - тумор детектован у 1-3 регионална лимфна чвора	30
N2 - тумор детектован у више од 4 регионална лимфна чвора	0
N3 - тумор детектован у апикалним и васкуларним „trunk“ лимфним чворовима	10
M0 - Без детектованих метастаза	60
M1 - Детектоване метастазе	30

4.3.2 Изолација примарне ћелијске културе из ткивних узорака колоректалног карцинома и потврђивање вијабилности

Ткива колоректалног карцинома добијена од пацијената су коришћена за даље анализе, при чему су механичком и ензимском манипулацијом разложена на ћелијске суспензије. Након 24 сата од засејавања у флашкове, формирана је примарна ћелијска култура (изглед представљен на **Слици 17**) која је коришћена за испитивање ефеката киселине млека 10H2DA. У саставу добијене примарне ћелијске културе су уочена два доминантна фенотипа ћелија, епителне и мезенхимске ћелије, које су образовале кластере (скупове), што се може уочити на **Слици 17**. Епителне ћелије се карактеришу плочастим изгледом, за разлику од мезенхимских, карактеристичних по вретенастом облику и издуженим цитоплазматичним наставцима.



Слика 17. Изглед примарне ћелијске културе изоловане из ткивних узорака колоректалног карцинома. Скала: 50 μm .

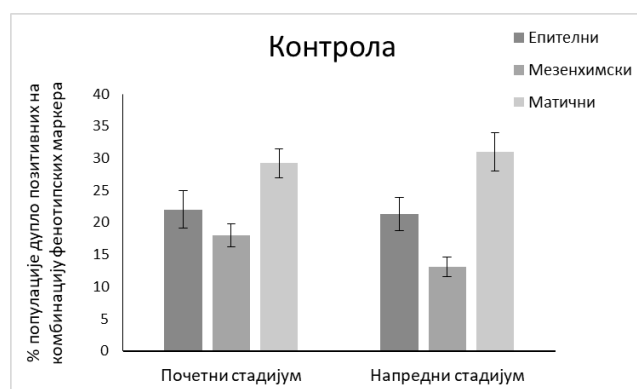
Утицај киселине 10H2DA на вијабилност примарне ћелијске културе је испитиван употребом методе трипан плаво. Бројање ћелија је вршено након подизања ћелија трипсином из микротитар плоче са 6 бунарића, у којима је ћелијска суспензија била инкубирана 24 сата у медијуму за култивацију, или у третману киселином у концентрацијама 10 и 100 μM . Резултати су показали да третман киселином није имао никаквог утицаја на проценат вијабилних ћелија у обе апликоване концентрације и добијене IC_{50} вредности су биле више од 100 μM .

4.3.3 Фенотипизација ткивних узорака колоректалног карцинома у контроли и третманима

Фенотипизација ткивних узорака колоректалног карцинома у контроли

Узорци ткива добијени од пацијената I и II стадијума CRC-а су груписани у почетни стадијум, док су ткива III и IV стадијума CRC-а груписани у напредни стадијум. Оваква категоризација узорака је спроведена из разлога што је циљ истраживања био упоређивање резултата ефеката третмана на примарној ћелијској култури са резултатима добијеним на имортализованим ћелијским линијама изолованих из II и IV стадијума CRC-а.

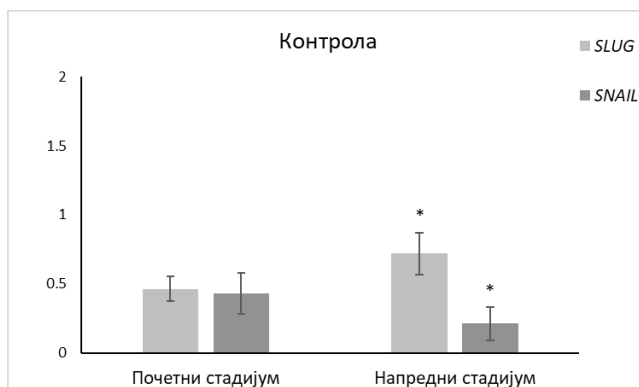
Нетретиране (контролне) ћелије ткива сваког пацијента су фенотипски окарактерисане методом проточне цитометрије на протеинском нивоу употребом комбинације по два маркера за сваки фенотип: Е-кадхерин и ЕрСАР за епител (Графикони 4 и 5 у Прилогу); виментин и α -SMA за мезенхим (Графикони 8 и 9 у Прилогу); и NANOG и ALDH1B1 за матични фенотип (Графикони 12 и 13 у Прилогу). Разлике у фенотипској заступљености у почетном и напредном стадијуму су представљене на **Графикону 34**. Из приложеног можемо видети да је у почетном стадијуму доминантна субпопулација са одликама матичности, и релативно је висока експресија епителне субпопулације, док је мезенхимални фенотип најмање експримиран, што је у складу са стадијумом CRC-а. Међутим, у популацији изолованој из напредних стадијума, субпопулација матичних ћелија је више заступљена него код почетног стадијума, што указује на агресивност карцинома. Заступљеност епителног фенотипа је благо нижа у односу на почетни стадијум, а субпопулација мезенхимског фенотипа је значајно нижа у односу на почетни стадијум.



Графикон 34. Фенотипски профил нетретиране ћелијске популације изоловане из ткива почетног и напредног стадијума CRC-а.

Обзиром да је регулација фенотипова под утицајем регулаторних, али и ефекторних маркера ЕМТ-а, испитивани су *SLUG* и *SNAIL* на генском нивоу, од чије регулативе зависе првенствено епителни и мезенхимски, али и матични фенотип.

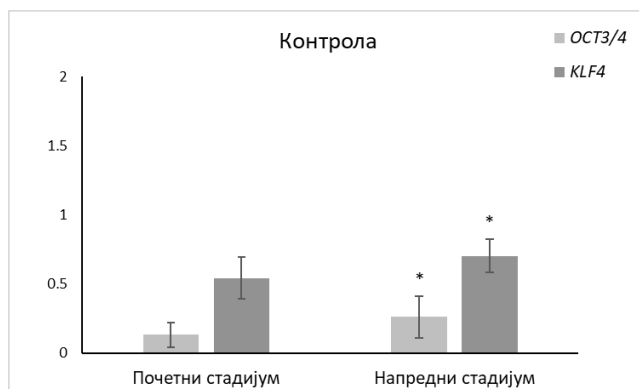
У почетном стадијуму, нивои експресије ових маркера су у приближно једнаком односу, при чему је нешто нижи ниво уочен код *SNAIL*-а (**Графикон 35**). У напредном стадијуму, експресија *SLUG*-а је значајно повећана у односу на почетни стадијум, док је експресија *SNAIL*-а значајно нижа у односу на почетни стадијум.



Графикон 35. Релативна генска експресија маркера ЕМТ-а у нетретираној ћелијској популацији изолованој из ткива почетног и напредног стадијума CRC-а.

* $p < 0.05$ указује на статистички значајну разлику између стадијума.

За испољавање матичног фенотипа, кључну улогу играју транскрипциони фактори матичности *OCT3/4* и *KLF4*, чија је генска експресија такође праћена. Разлике између нивоа експресије ова два маркера у почетном и напредном стадијуму су очигледне и представљене на **Графикону 36**.



Графикон 36. Релативна генска експресија маркера матичности у нетретираној ћелијској популацији изолованој из ткива почетног и напредног стадијума CRC-а.

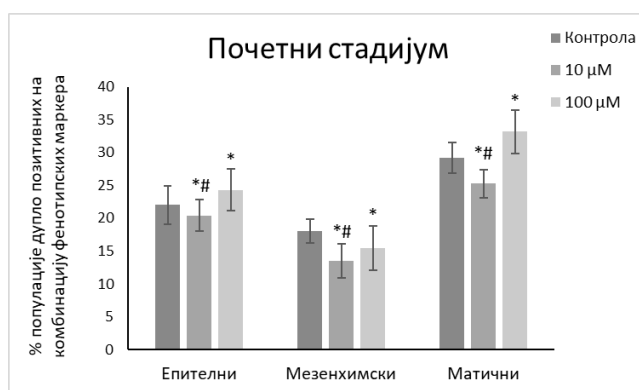
* $p < 0.05$ указује на статистички значајну разлику између стадијума.

Наиме, интензитет експресије *OCT3/4* и *KLF4* на генском нивоу је низак у ћелијама почетног стадијума у односу на напредни стадијум. Међутим, генска експресија ових маркера је примећена у значајно повећаном нивоу у напредном стадијуму. Када се упореде вредности експресије ова два фактора, приметно је да је ниво *KLF4* је значајно виши него *OCT3/4*.

Фенотипизација ткивних узорака колоректалног карцинома у третманима

Промене у заступљености фенотипских профила примарне ћелијске културе **почетног и напредног стадијума** су праћене на протеинском (**Графикони 6, 7, 10, 11, 14 и 15** у Прилогу) и генском нивоу у третману киселином млеча 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM , као ефикаснијег третмана, након 24 сата.

Разлике између ефеката две концентрације 10H2DA на фенотипски профил ћелија **почетног стадијума** су очигледне (**Графикон 37**). Нижа концентрација киселине је имала статистички значајан инхибиторни ефекат на заступљеност свих испитиваних фенотипова. При том је под утицајем ниже концентрације 10H2DA најзначајније смањена заступљеност мезенхимског фенотипа, редукцијом заступљености популације са експримираним маркерима, виментином и α -SMA. Затим следи смањење процента популације матичног фенотипа, као и редукција експресије NANOG и ALDH1B1 маркера матичности. Епителни фенотип је најмање редукован у односу на контролу (нетретиране ћелије), а 10H2DA је у нижој концентрацији инхибирала експресију Е-кадхерина и ЕрCAM-а. Насупрот томе, 100 μM 10H2DA је значајно повећала ниво заступљености епителног и матичног фенотипа, на шта указује повећање у маркерима епитела: Е-кадхерина и ЕрCAM-а, и матичности: NANOG и ALDH1B1. Истовремено, ова концентрација киселине је снизила процентуалну заступљеност популације мезенхимских ћелија преко смањења експресије мезенхимских маркера виментина и α -SMA (**Графикон 37**).



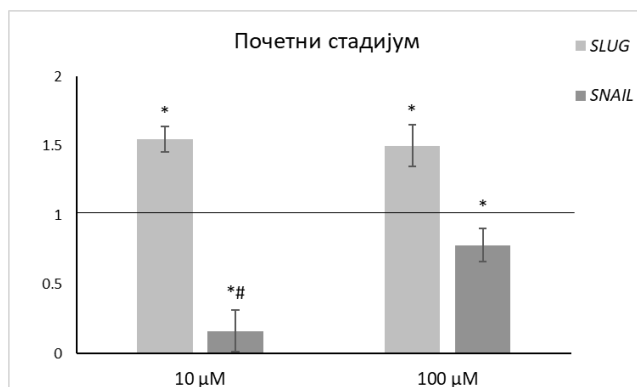
Графикон 37. Фенотипски профил ћелијске популације изоловане из ткива почетног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM , у односу на контролу.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Експресија маркера EMT-а, *SLUG*-а и *SNAIL*-а, испитивана на генском нивоу у примарној ћелијској култури изолованој из почетног стадијума, је анализирана и под утицајем третмана, а резултати су представљени на **Графикону 38**.

Повећан ниво експресије *SLUG*-а у почетном стадијуму у односу на контролу (нетретиране ћелије) је уочен под дејством обе апликоване концентрације

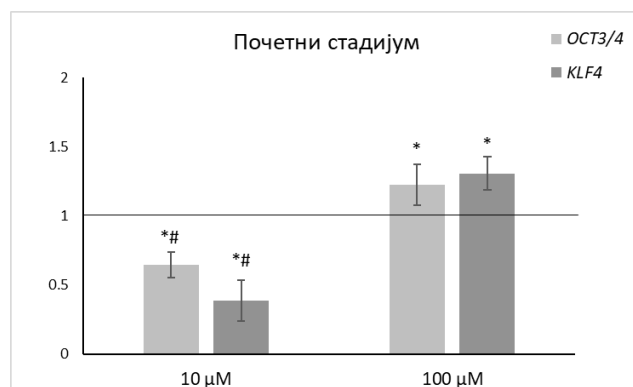
10H2DA. Експресија *SNAIL*-а је била значајно снижена у третману нижом концентрацијом киселине и у односу на контролу. Међутим, виша концентрација киселине је довела до повећања експресије *SNAIL*-а, али је експресија овог маркера и даље остала нижа у односу на контролне вредности.



Графикон 38. Релативна генска експресија маркера ЕМТ-а у ћелијској популацији изолованој из ткива почетног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM . Резултати су представљени у односу на контролни (housekeeping) ген β -актин (означено цртом); * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Нивои релативне генске експресије регулаторних маркера матичности *OCT3/4* и *KLF4* су модулирани под утицајем третмана који је изазвао различите одговоре ћелија изолованих из почетних стадијума. Експресија *OCT3/4* и *KLF4* транскрипционих фактора је била значајно смањена под утицајем 10 μM киселине, у односу на контролу.

Виша концентрација киселине је изазвала повећање нивоа експресије ова два маркера матичности, када се вредности пореде са контролом, при чему је нешто виши ниво експресије *KLF4* регулатора био уочен у односу на *OCT3/4* (Графикон 39).



Графикон 39. Релативна генска експресија маркера матичности у ћелијској популацији изолованој из ткива почетног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM . Резултати су представљени у односу на контролни (housekeeping) ген β -актин (означено цртом); * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

На основу добијених резултата, може се закључити да је нижа концентрација киселине (10 μM) имала јачи супресивни ефекат на експресију, како мезенхимских, тако и маркера матичности у ћелијама почетног стадијума. Ови резултати су у корелацији са резултатима добијеним у овом третману на нивоу испитиваних ћелијских фенотипова почетног стадијума на протеинском нивоу.

Што се ефеката киселине 10H2DA на **напредне стадијуме** тиче, резултати показују да је третман успео да значајно снизи заступљеност свих испитиваних фенотипова: епителног, мезенхимског и матичног у обе примењене концентрације. Киселина је најбоље инхибиторне ефекте имала на процентуалну заступљеност епителне популације преко супресије Е-кадхерина и ЕрСАМ-а. Популација матичних ћелија је значајно снижена у овим третманима преко инхибиције експресије NANOG-а и ALDH1B1. Значајније супресивно дејство третмана на епителни и матични фенотип је уочено у нижој концентрацији (10 μM) третмана киселином.

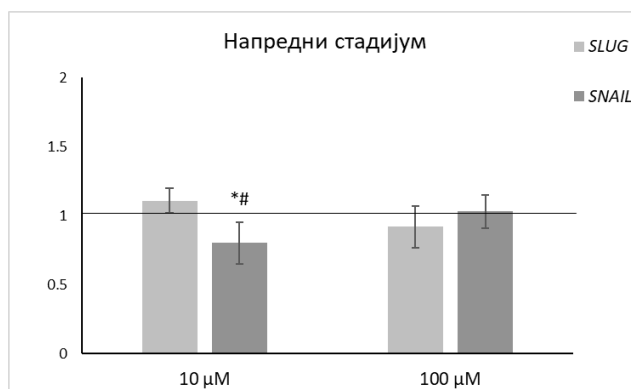
Супресијом мезенхимских маркера виментина и α -SMA, удео мезенхимског фенотипа је редукован, при чему је је виша концентрација третмана испољила јачи инхибиторни ефекат (**Графикон 40**).



Графикон 40. Фенотипски профил ћелијске популације изоловане из ткива напредног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM , у односу на контролу.

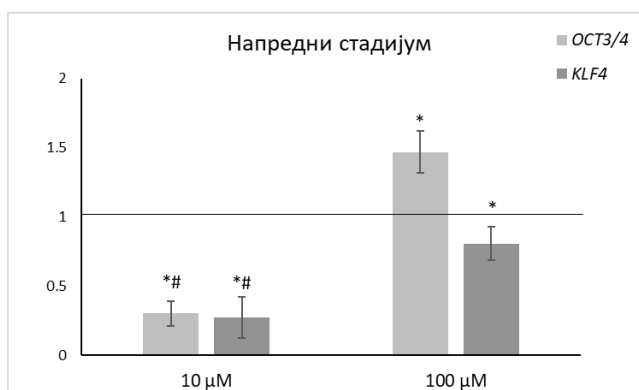
* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Значајне ефекте у супресији фактора ЕМТ-а индуковала је нижа концентрација третмана 10H2DA (10 μM), и то редукцијом експресије *SNAIL*-а. Ефекти третмана на остале маркере нису показали значајне ефекте (**Графикон 41**).



Графикон 41. Релативна генска експресија маркера ЕМТ-а у ћелијској популацији изолованој из ткива напредног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM. Резултати су представљени у односу на контролни (housekeeping) ген β -актин (означено цртом); * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Врло слично као и у почетном стадијуму, нижа концентрација киселине је имала значајан супресивни ефекат на регулаторне маркере матичности *OCT3/4* и *KLF4*, при чему је нешто нижи ниво био уочен код експресије *KLF4* гена (**Графикон 42**).



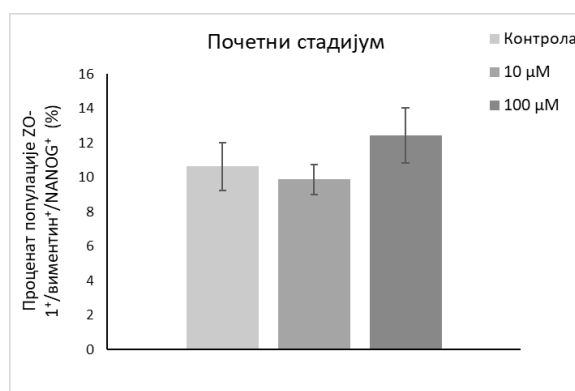
Графикон 42. Релативна генска експресија маркера матичности у ћелијској популацији изолованој из ткива напредног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM. Резултати су представљени у односу на контролни (housekeeping) ген β -актин (означено цртом); * $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

Али за разлику од ефеката ове концентрације киселине на почетни стадијум, у напредном је третман имао јаче инхибиторно дејство на експресију маркера *OCT3/4* и *KLF4*. На **Графикону 42** се може видети да је транскрипциони фактор *OCT3/4* био повећано експримиран утицајем више концентрације третмана, у односу на контролу, док је експресија *KLF4* значајно нижа у односу на контролу. Очигледно је да смањење генске експресије *KLF4* корелира са супресијом матичног фенотипа напредног стадијума.

4.3.4 Карактеризација агресивног фенотипа са аспекта ЕМТ-а у популацији епителних ћелија

Агресивни фенотип ћелија са најснажнијим миграторним и инвазивним потенцијалом се карактерише експресијом мезенхимских и матичних маркера, и управо такав фенотип је анализиран на протеинском нивоу у овом одељку резултата. Применом комбинације маркера мезенхима – виментина, и матичности - NANOG-а, маркиране су ћелије у оквиру епителне популације карцинома (окарактерисане помоћу маркера ZO-1) (**Графикони 16, 17, 18 и 19** у Прилогу). Ћелије које се одликују присуством сва три маркера имају карактеристике агресивног фенотипа ЕМТ-а.

У контролним (нетретираним) узорцима почетног и напредног стадијума је уочена разлика у процентуалној заступљености овакве популације ћелија, при чему је знатно већи проценат забележен у напредном стадијуму (**Графикони 43 и 44**). Овакав резултат је и очекиван, обзиром на то да је познато да је напредни стадијум карцинома агресивнији од почетног. Када је третман апликован, разлике у одговору ћелија су такође биле приметне, како у односу на контролу, тако и између почетног и напредног стадијума (**Графикони 43 и 44**).



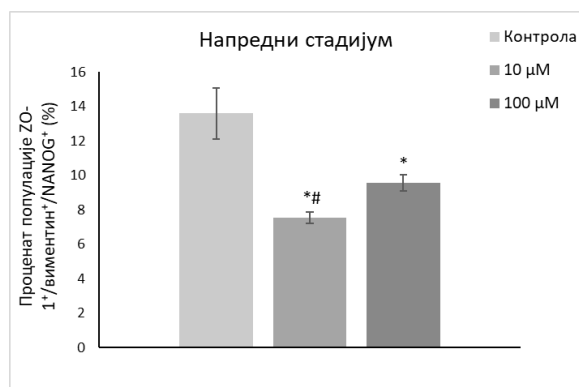
Графикон 43. Проценат популације ћелија са најагресивнијим фенотипом у нетретираним (контролним) узорцима колоректалног карцинома почетних и напредних стадијума и узорцима ових стадијума третираних киселином 10H2DA.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

У почетном стадијуму, третман је у нижој концентрацији успео да смањи заступљеност агресивног фенотипа преко редукције маркера мезенхима виментина и маркера матичности NANOG-а, док је виша концентрација имала опозитни ефекат. Наиме, концентрација 100 μM је стимулисала експресију овог фенотипа, преко повећања поменутих маркера.

Са друге стране, у напредном стадијуму је агресивни фенотип био успешно и статистички значајно супримиран од стране 10H2DA у обе примењене концентрације. Нижа (10 μM) концентрација је ипак имала истакнутији супресивни

ефекат који је испољила преко инхибиције протеинске експресије оба маркера, и виментина и NANOG-а, у испитиваној популацији ћелија CRC-а (**Графикон 43**).



Графикон 44. Процент популације ћелија са најагресивнијим фенотипом у нетретираним (контролним) узорцима колоректалног карцинома напредног стадијума и узорцима ових стадијума третираних киселином 10H2DA.

* $p < 0,05$ указује на статистички значајну вредност у односу на контролу, док # $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између концентрација третмана.

5. ДИСКУСИЈА

Канцер, као болест модерног доба, представља значајан здравствени проблем у целом свету, а колоректални карцином (CRC) спада у један од најучесталијих типова канцера. Према најновијим подацима Светске здравствене организације, овај малигнитет заузима треће место на светском и европском нивоу, одмах након карцинома дојке и плућа. У Србији је он такође један од најучесталијих карцинома, и његова заступљеност у оба пола и у свим старосним добима износи преко 12% свих малигнитета у 2020. години (International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020). У Европи је стопа преживљавања пацијената оболелих од метастатског CRC-а процењена на око 12%, са медијаном укупног преживљавања од око две и по године (Molinari и сар., 2018).

Све форме CRC-а настају из преканцерозних лезија. Најчешћа форма преканцерозних лезија од којих настају спорадичне форме CRC-а је аденом, а 10-15 година је временски период у коме се аденом развија у инвазивни облик CRC-а (Zheng и сар., 2023). Ипак, CRC је излечива болест, или се може довести у хроничну форму болести, што је императив лечења. Уколико се благовремено предузму мере, као што су праћење пацијента и одговарајући скрининг, извесно је да је могуће спречити развој инвазивних форми CRC-а. Ово представља једну од најефикаснијих мера за спречавање настанка CRC-а и резултује значајним смањењем процента смртних исхода, што је до сада потврђено у развијеним земљама (Mokhtari и Zakerzade, 2017; Zheng и сар., 2023). Програми скрининга CRC-а се последњих година уводе у праксу у многим европским земљама, и обично се заснивају на рутинским анализама фецеса и/или колоноскопским прегледима (Albers и сар., 2023). На глобалном нивоу се употребом благовремених скрининг тестова, инциденца и 5-годишња стопа морталитета ове болести значајно смањује (Maes-Carballo и сар., 2022).

У Србији је хируршко одстрањивање овог типа канцера још увек уобичајен први корак у протоколу лечења CRC-а, уз адекватну примену хемиотерапије и радиотерапије (зрачења) (Kalantari и сар., 2022). Овакав конвенционалан приступ лечењу је основа протокола лечења, а новији терапеутски поступци и приступи све више стављају појединачног пацијента у фокус. Кроз персонализовани приступ се примењује адекватна терапија и смањује потенцијална резистентност. Обзиром на широку примену хемиотерапеутика поред значајног токсичног ефекта на здраво ткиво и цео организам, ови лекови изазивају и резистентност туморског ткива (Šeklić, 2018).

Резистентност коју канцер развија на терапију представља озбиљан проблем у третману CRC-а, а у основи стоји присуство ћелија са матичних одликама. Матичност, као критични механизам потребан за стицање ове одлике карцинома, је у спрези са ЕМТ процесом који је константно индукован и

стимулисан у CRC-у. Ова два механизма, матичност и EMT, играју најважнију улогу у развијању јаког резистентног фенотипа карцинома (Yao и сар., 2016).

Упркос свим овим, до сада примењеним приступима у лечењу CRC-а, а у односу на сложеност и проблематику болести, још увек не постоји формулисана ефикасна терапија за узнатредовале облике CRC-а са јаким инвазивним и метастатским потенцијалом (Albers и сар., 2023).

Поред хемијски синтетисаних терапеутика у новијим истраживањима све се више испитују ефекти традиционално коришћених лекова. Генерално, традиционална медицина подразумева примену природних производа у циљу очувања здравља, у превенцији или лечењу различитих болести, међу којима спада и карцином. Природни производи су добри извори супстанци и једињења са значајним фармаколошким дејствима. Од давнина се користе многобројне биљне врсте, гљиве, лишајеви, микроорганизми, и животињски продукти из којих се биоактивне супстанце изолују и апликују у виду екстракта, облога, тоника, чајева, тинктура и различитих других формулација (Yuan и сар., 2016; Šeklić и сар., 2018). Велики број природних производа са традиционалном употребом све више налази своју примену и у биомедицини савременог доба.

Многобројна досадашња истраживања су резултовала изолацијом различитих биоактивних једињења из природних извора која су укључена у клиничку употребу, нарочито у терапији канцера, а напредак и у откривању нових је константан (Ali Abdalla и сар., 2022). Предност природних производа се огледа у томе што имају ретко негативне последице на здраво ткиво, па доприносе општем побољшању стања организма и имунског одговора.

Природни производи и њихове појединачне компоненте поседују биоактивна својства која се огледају у модулацији молекуларних механизма, као и у супресивним/стимулативним ефектима на циљане молекуле у ћелијама. До сада су потврђена дејства природних производа на нивоу регулације сигналних путева апоптозе, пролиферације, неопластогенезе, инвазије и миграције, и др. (Housman и сар., 2014). За разлику од хемијски синтетисаних једињења, ова једињења најчешће испољавају селективни ефекат, што за последицу има циљану активност у карциномским ћелијама без негативних ефеката на здраве ћелије. Многи природни производи испољавају ефекте у смислу супресије миграторног и инвазивног потенцијала у карциномским ћелијама, таргетирајући специфичне компоненте сигналних путева одговорне за ове процесе (Lichota и Gwozdzinski, 2018).

Један од најзначајнијих фактора ризика за настанак и развој CRC-а је начин исхране (Šeklić, 2018; Albers и сар., 2023). Модификација у исхрани, као што је примена функционалних дијететских суплемената, могу побољшати ефикасност терапија канцера (Johal и сар., 2022). У том смислу, неопходна су детаљна и опсежна испитивања предложеног природног производа или супстанце, како на

карциномским, тако и на здравим модел системима, у преклиничким испитивањима, а затим и у опсежним клиничким испитивањима.

У преклиничким истраживањима на пољу канцера се интензивно користе ћелијске линије, у циљу бољег разумевања тумора. Уједно овај модел систем може допринети развоју и унапређењу терапеутика са аспекта утицаја на појединачни, строго дефинисани тип карциномских ћелија (Ladke и сар., 2023). Анализе које се спроводе на ћелијским линијама су база сваког преклиничког испитивања и у основи су брзог скрининга. Опсежна испитивања на њима обухватају већи број линија истог стадијума канцера, обзиром на присуство широког дијапазона ћелијских типова у оквиру једног карциномског ткива. Такође, истраживања треба комплетирати и на ћелијама различитих стадијума једног малигнитета. Овај модел систем омогућава анализу одређеног типа карцинома, али и специфичног стадијума ове болести чиме се може детаљно разјаснити молекуларни механизми настанка и напредовања малигнитета, његових морфолошких одлика и метаболичких процеса. Такође, спровођење испитивања на ћелијским линијама даје увид у ефикасност различитих агенаса и механизам њиховог дејства. У складу са тим, ћелијске линије омогућавају истраживања и на различитим стадијумима канцера, која се могу и упоређивати. Ћелијске линије представљају врло практичан модел систем јер се могу релативно лако модификовати у смислу изазивања специфичних генских мутација или промена у различитим ћелијским механизмима. Овако измењен модел систем се прилагођава типу истраживања и погодан је за тестирање и развој циљане терапије.

Имортализоване ћелијске линије су успостављене и користе се већ деценијама из простог разлога што се ткивни узорци врло тешко могу добити, а успешно успостављање вијабилне ћелијске културе је врло компликован подухват, нарочито за CRC (Pastor и сар., 2010). Додатно, ћелије изоловане из ткивних узорака имају врло кратак животни век, јер веома брзо отпочиње процес старења, и то представља проблематичан временски оквир за добијање релевантних података у експерименталним истраживањима (Pastor и сар., 2010; Bian и сар., 2021). Због тога је употреба имортализованих ћелијских линија утемељила преклиничка испитивања у области тестирања терапеутских агенаса, метаболичких процеса, ћелијске сигнализације, диференцијације, пролиферације, ћелијске смрти, миграције, инвазије, а овај модел систем је нашао примену у ткивном инжењерству (Pastor и сар., 2010; Šeklić, 2018). За потребе експерименталних испитивања, ћелијске линије се користе у анализи биологије тумора, понашања карциномских ћелија у различитим условима, и развоју антитуморских терапија (Pastor и сар., 2010). Предност имортализованих ћелијских линија се огледа и у томе што су исплатив, а неограничени материјал, и једноставан модел систем за манипулацију за који нису потребне дозволе етичких одбора. Ћелијске линије су пречишћене хомогене популације које обезбеђују поновљиве резултате који су упоредиви (Kaur и Dufour, 2012). Предности

испитивања потенцијалних, новодизајнираних или већ постојећих терапеутских агенаса употребом ћелијских линија подразумевају упоредну анализу како на малигним, тако и на здравим ћелијама у сврху контроле (Šeklić, 2018).

Један од главних недостатака употребе ћелијских линија су бројне генетске модификације које се додатно акумулирају сваким пасажом на спонтан начин. Ова појава резултира присуством врло често уочљивих варијабилности у кључним карактеристикама ових ћелија. Ћелијске линије подлежу променама у смислу структуре и броја хромозома, затим пролиферативног капацитета, стичу резистентност, имају дерегулисану пермеабилност и измењене способности транспорта, као и промењен метаболизам. Одликују се врло често измењеном ћелијском морфологијом и експресијом маркера, па испитивања која се на њима спроводе могу да буду неадекватна, уместо да пруже поуздане и релевантне податке. Такође, проблематику представља и мали број изолованих ћелијских линија, узимајући у обзир велики број различитих типова ћелија које чине туморско ткиво.

Употреба ћелијских линија даје податке на субцелуларном нивоу, што омогућава боље разумевање молекуларне базе болести. Међутим, не сме се занемарити чињеница да се испитивања спроводе у врло контролисаним експерименталним условима, који не представљају реалну слику тумора. Различите студије су показале неподударање генске и протеинске експресије комерцијално доступних ћелијских линија са примарним ћелијским линијама. Врло је компликовано, а такође и скоро немогуће, обухватити све генске и епигенетске варијације које се јављају на нивоу сваког пацијента употребом ограниченог броја имортализованих ћелијских линија (Richter и сар., 2021). Ћелије у *in vivo* условима су под константним утицајем врло деликатних физиолошких, биохемијских регулаторних фактора, али и окружења (Pastor и сар., 2010). Недостатак услед изостанка интеракција ћелијске културе са другим типовима ћелија је очигледан, обзиром да се ткиво канцера одликује великом хетерогеношћу и функциоаност ткива умногоме зависи од међућелијских интеракција. Повећањем броја пасажа, у оквиру једне ћелијске линије се последично може јавити хетерогеност у култури и варијабилност у одговору на исти стимулус, па се могу добити различити резултати. Стога, експерименте у којима су добијени значајни резултати на имортализованим ћелијским линијама, је свакако потребно потврдити на примарним ћелијским културама (Kaur и Dufour, 2012).

Примарне ћелијске културе карцинома, добијене изолацијом ћелија из ткива, узоркованих приликом биопсија током хируршких захвата, се добијају као резултат механичке или ензимске деградације, или комбинацијом обе технике. Све растућа потреба за изолованим ћелијским културама из ткивних узорака се огледа у неопходности примене оваквог модел система за евалуацију нових антитуморских третмана. Предности које несумњиво поседује примарна ћелијска култура је у великој мери очувано природно окружење тумора, као и његова

хетерогеност, а самим тим и оригиналне карактеристике тумора. Примарне културе су значајне јер садрже и матични фенотип, који је од изузетне важности за преклиничке анализе агресивног и резистентног понашања малигног ткива. Карактеристике матичности су у великој мери редуковане код стандардних имортализованих комерцијално доступних ћелијских линија, што умногоме отежава испитивања на пољу резистентности и агресивности канцера. Примарне ћелијске културе дају увид и у варијацијама, како генских тако и епигенетских, које се јављају на индивидуалном нивоу пацијената, али и у смислу одговора на одређене терапије. Стога, култивацијом и применом примарне ћелијске културе се успоставља управо персонализовани приступ болести и омогућава побољшање постојећих терапија. Такође, овај модел систем доприноси развоју и имплементацији персонализованих терапија, што постаје ултимативни циљ онкологије (Richter и сар., 2021). Последично овакви *ex vivo* системи много боље одговарају оригиналном тумору у смислу биолошког понашања и молекуларних карактеристика. У њима су присутне епителне, стромалне, имуне ћелије које се могу испитивати, док су имортализоване ћелијске линије хомогене популације (Ladke и сар., 2023).

Од изузетне је важности унапређење конвенционалног начина лечења канцера у смислу индивидуалног приступа пацијентима. Анализа појединачних пацијената треба бити императив, обзиром да је сваки организам јединствен, па самим тим и не може се очекивати и исти одговор на терапију. Поред тога, анализом великог броја појединачних пацијената и њихових одговора на терапију могуће је груписати пацијенте са сличним карактеристикама у циљу примене адекватне терапије.

Обзиром на све претходно наведене проблематике у истраживањима на пољу канцера, циљ ове дисертације је анализа ефеката млеча и киселине 10H2DA на процесе миграције, инвазије, ЕМТ-а и матичности ћелија колоректалног карцинома. Ефекти су испитивани на имортализованим ћелијским линијама, да би касније били упоређени и са ефектима добијеним на примарним ћелијским културама изолованих из ткивних узорака пацијената оболелих од CRC-а.

Карактеризација млеча на основу заступљености активних компоненти

Матични млеч (ММ), као један од најцењенијих пчелињих производа, био је познат и употребљаван широм света још од давнина у традиционалној медицини (Bogdanov, 2016; Nascimento и сар., 2015). Коришћење овог природног производа проистиче из његових многоструких благотворних дејстава по људско здравље, као што су: антиоксидативно, хепатопротективно, хипогликемијско, хипотензивно, антибиотско, антиинфламаторно, антитуморско. Такође је коришћен као тоник против старења и у сврху побољшања општег здравља у форми функционалне хране или дијететског суплемента.

Функционална храна подразумева сву храну која испољава биолошки активна деловања и помаже очувању здравља утичући на поједине телесне функције. Један од препознатљивих природних производа, матични млеч, се сматра врло ефикасним дијететским суплементом са многобројним позитивним ефектима по људско здравље. Окарактерисан је као суперхрана јер садржи све неопходне компоненте за развој једног живог бића.

Поред витамина, минерала, хормона, ензима, нуклеотида, угљених хидрата, глицерола, слободних органских киселина, садржи липиде од којих најизраженије ефекте испољава незасићена масна киселина 10H2DA (Orsolić, 2013; Ahmad и сар., 2020). Млеч у свом саставу такође поседује и феноле (4-10%), са већ познатим антиканцерским ефектима (Orsolić, 2013).

Своја цењена биолошки активна својства, ММ у највећој мери дугује поменутој киселини, али и фенолима, стога је неопходно обратити пажњу на ове компоненте и разјаснити њихове улоге у испољеним антимигранторним и антиинвазивним дејствима тестираног узорка ММ-а (Orsolić, 2013).

Фенолни профил ММ-а

Порекло фенола у ММ-у је углавном из полена биљака које пчеле користе за исхрану, а варијација фенолних компоненти у њему у многоме зависи од биодиверзитета флоре екосистема (Maghsoudlou и сар., 2019; Ahmad и сар., 2020).

Феноли су секундарни метаболити биљака и синтетишу се као ефективна заштита од неповољних спољашњих услова, а представљају неопходне конституенте људске исхране и компоненте са изразитим позитивним дејствима по људско здравље. Пролазе кроз дигестивни тракт као несварљива компоненета хране и своје дејство испољавају највише у дебелом цреву где под дејством бактерија бивају обрађени. Њихово позитивно дејство испољава се пре свега на нивоу имунитета али не треба занемарити дејство ових једињења или њихових компоненти као сигналних молекула у ћелијама.

Флавоноиди су група полифенола који су показали много благотворних активности, и до сада је идентификовано више од 8000 врста флавоноида (Mutha и сар., 2021). Иако је познато да ММ садржи флавоноиде, углавном: кверцетин, нарингенин, нарингин, хесперидин, акацетин, хризин, фисетин, кемпферол, пинобанксин, галангин, пиноцембрин и рутин (Viuda-Martos и сар., 2008; Kocot и сар., 2018), врло мало података постоји о њиховим концентрацијама у овом производу. Познато је да су природни производи смеше различитих биоактивних једињења и да свако од њих има своје дејство на ћелије, битно је истаћи да ефекти целог производа треба разматрати и као синергистичко деловање активних супстанци присутних у њему. Није непознато да биоактивна једињења могу деловати антагонистички и поништити дејство један другом, па је у третманима природним производима веома важно знати њихов састав и количински удео појединих једињења, а све у циљу утврђивања и дефинисања ефекта потенцијално

активних супстанци у њему и производа у целини. Недостатак оваквих информација о ММ-у, нарочито његовом флавоноидном профилу и концентрацијама присутних специфичних флавоноида, је био разлог да наш узорак ММ-а испитамо у овом смислу и идентификујемо присутне конститутивне флавоноиде и одредимо њихове тачне концентрације.

Досадашњим анализама различитих узорака млеча дошло се до закључка да највећу процентуалну заступљеност углавном имају фенолне киселине (68-100%), праћене флавоноидима (0,1-12%), и флаванонима (1,2-10,2%), док флавоноли и антоцијанидини нису детектовани (López-Gutiérrez и сар., 2014).

У нашој студији, профил детектованих флавоноида у тестираном узорку ММ-а је обухватао 4 класе: флавоноле, антоцијанидине, фенолних киселине и флаваноне. Највећу процентуалну заступљеност имали су флавоноли (74,65%), затим фенолне киселине (13,6%), антоцијанидини (11,2%) и на крају флаванони (0,6%). Компоненте које су уочене у изразито значајним концентрацијама су: епикатехин галат (115,29 $\mu\text{g/mL}$), епикатехин (36,04 $\mu\text{g/mL}$), цијанидин-3-глукозид (25,48 $\mu\text{g/mL}$), р-кумаринска киселина (17,10 $\mu\text{g/mL}$), кемпферол (13,52 $\mu\text{g/mL}$) и синапинска киселина (7,47 $\mu\text{g/mL}$). Што се феруличне киселине тиче, коју су López-Gutiérrez и сар. (2014) детектовали у концентрацији 0,018 $\mu\text{g/mg}$ (15 413 $\mu\text{g/kg}$), у нашем узорку ММ-а она је била примећена у концентрацији од 2,83 $\mu\text{g/mL}$, што је значајно више.

Обзиром да нема пуно података о концентрацији флавоноида у ММ-у, неке од наших резултата смо упоредили са прополисом, као најближом супстанцом млечу, обзиром да води порекло од пчела и настаје уз помоћ ензима из њихових плувачних жлезда (Mello и сар., 2010). Према Mello и сар. (2010) кумаринска киселина је била присутна у раствору прополиса у концентрацији 1,5 $\mu\text{g/mL}$, што је јако ниска концентрација у односу на ову фенолну киселину детектовану у нашем узорку ММ-а (17,10 $\mu\text{g/mL}$). Међутим, у другој студији, кумаринска киселина је била присутна у концентрацији 18,08 $\mu\text{g/mL}$ (Saleh и сар., 2023), што је приближна вредност нашој, а концентрација кемпферола је била 18,11 $\mu\text{g/mL}$, што је нешто више него у нашем узорку ММ-а (13,52 $\mu\text{g/mL}$). Alberti и сар. (2019) су детектовали у етанолном екстракту прополиса р-кумаринску киселину у концентрацији 4,1 $\mu\text{g/mL}$ и синапинску киселину у концентрацији 0,9 $\mu\text{g/mL}$. Обе ове вредности су знатно ниже у односу на вредности ових компоненти детектованих у нашем узорку ММ-а. Према подацима студије везане за нектар биљке врсте *C. sinensis*, компоненте епикатехин и епикатехин галат су детектоване у концентрацијама 1,13 и 0,921 $\mu\text{g/mL}$ (Gong и сар., 2021), што су јако ниске вредности у односу на концентрације ових флавоноида у нашем узорку ММ-а.

У односу на анализиране резултате и према расположивим литературним подацима, можемо закључити да је наш тестирани узорак ММ-а веома богат флавоноидима и то у високим концентрацијама.

Флавоноиди испољавају значајне биолошке ефекте као што су: антиоксидативне, антиинфламаторне, антивирусне, неуро- и кардио-протективне, антиканцерске (Ullah и сар., 2020). Анतिकанцерски ефекти флавоноида су повезани са бројним сигналним путевима које могу да модулирају током иницијације, али и прогресије канцера, укључујући инвазивност, миграцију и формирање удаљених метастаза. Флавоноиди могу да утичу на кључне регулаторе епително-мезенхимске транзиције или молекуле, као што су TGF- β фактор раста или MMP. Флавоноиди имају јасан потенцијал за побољшање ефикасности конвенционалних хемиотерапеутских антиканцерских агенаса (Liskova и сар., 2020). Обзиром да су поједини флавоноиди уочени у анализираном узорку млеча у врло високим концентрацијама (епикатехин галат, епикатехин, цијанидин-3-глукозид, р-кумаринска киселина, кемпферол и синапинска киселина), веома је важно поменути их појединачно, и разјаснити њихову улогу у механизмима антимигрантног и антиинвазивног дејства овог производа.

Катехини представљају класу флавоноида са улогом у спречавању инфламације, антиоксидативној заштити ћелија али и таргетирање одређених молекула и сигналних путева у канцеру па тако испољавају и антиканцерска дејства. Главни катехини, које смо и ми детектовали у високим концентрацијама у нашем узорку ММ-а су епикатехин (енгл. *(-)-epicatechin* (EC)) и епикатехин галат (енгл. *(-)-epicatechin-3-gallate* (ECG)). Епикатехин галат (ECG), који је у ММ-у био доминантна компонента детектована у врло високој концентрацији (115,29 $\mu\text{g/mL}$), је биоактивни флавоноид, природни антиоксиданс са ефектима на различите типове канцера у смислу супримирања раста туморске масе.

ECG ефективно инхибира карциногенезу изазвану инфламацијом, како у мукози колона тако и у туморима колона који напредују у CRC и има способност директне интеракције са различитим молекулима у карциномским ћелијама, блокирајући или модулирајући експресију маркера током процеса канцерогенезе, и модификује различите сигналне путеве. Овај флавоноид у различитим типовима карцинома инхибира инвазију и миграцију карциномских ћелија, и супримира метастазирање карцинома регулацијом експресије MMP-а, стимулацијом експресије епителних маркера, као што је Е-кадхерин, инхибирањем мезенхимских маркера, и супресијом EMT-а, што је у корелацији са нашим резултатима (Huang и сар., 2016; Battistelli и сар., 2020; Li и сар., 2022). Такође, ECG има и диференцијациони потенцијал хуманих мезенхимских матичних ћелија (Вуин и сар., 2014), односно инхибира матичност што се тиче не само здравих већ и карциномски ћелија (Namiki и сар., 2020). Супресију популације прогениторских/матичних ћелија епикатехини највероватније испољавају узимањем учешћа у епигенетској регулацији експресије гена преко супресије ДНК метилтрансферазе. Претходна истраживања показују да ови флавоноиди врло блиско интерагују са ДНК и молекулима који регулишу генску експресију многих маркера, укључених у

процесе ЕМТ-а, инвазије, миграције и метастазе, што корелира са резултатима добијеним у овој студији (Cheng и сар., 2020).

Цијанидин-3-глукозид, такође детектован у високим концентрацијама у испитиваном узорку ММ-а (25,48 $\mu\text{g/mL}$), је флавоноид из групе антоцијанидина, и испољава антиоксидативне и анти-инфламаторне активности. Међутим, има и инхибиторно дејство на експресију β -катенина у ћелијама глиома (Ganai, 2022), миграторни и инвазивни потенцијал, као и експресију MMP-а, N-кадхерина и виментина, а заузврат стимулисао експресију E-кадхерина у ћелијама карцинома плућа (Chen и сар., 2006; Chen и сар., 2021). Овај флавоноид такође има естрогену активност и успешно се везује за естрогени рецептор β (ER β) у хуманим ћелијама и тако испољава своја дејства (Liu и сар., 2019). Цијанидин-3-глукозид има и анти-инвазивно и анти-миграторно дејство на карцином дојке, где супримира агресивно понашање ћелија овог типа карцинома, инхибирајући експресију SNAIL-а, SLUG-а, виментина, N-кадхерина, а појачавајући експресију епителних маркера E-кадхерина и ZO-1, и са позитивним ефектом на мезенхимско-епителну транзицију (MET) (Liang и сар., 2019). Још једна студија је указала на ова својства цијанидин-3-глукозида при чему је показано да овај антоцијанидин испољава своја анти-ЕМТ дејства повећавајући ниво KLF4 транскрипционог фактора у ћелијама карцинома плућа (Chen и сар., 2020). Студија на ћелијама колоректалног карцинома, SW-480 и HCT-116, је показала да цијанидин-3-глукозид има улогу у стимулацији експресије интегрина, молекула који су одговорни за ћелијске везе са подлогом, базалном мембраном, чиме се ћелијама онемогућава кретање и смањује им се инвазивни потенцијал (Baster и сар., 2020). На основу свега изнетог можемо закључити да је цијанидин-3-глукозид, детектован у нашем узорку ММ-а у високој концентрацији, флавоноид са изразито значајним анти-ЕМТ/миграторним/инвазивним својствима.

р-кумаринска киселина детектована у нашем узорку ММ-а у јако високој концентрацији (17,10 $\mu\text{g/mL}$) је раније показала антимиграторно дејство на ћелијама колоректалног карцинома што је чини веома обећавајућим потенцијалним анти-метастатски агенсом (Nasr Bouzaïene и сар., 2015).

За кемпферол је такође потврђено да има значајна антимиграторна и антиинвазивна својства на ћелије CRC-а (Wang и сар., 2022). Код других типова канцера успешно супримира Wnt/ β -катенин сигнални пут, редукује миграторни потенцијал, експресију MMP-ова и инвазивни потенцијал, учествује у сигнализацији у ћелијама карцинома дојке која је везана за естрогени рецептор и тиме утиче на експресију гена. Такође, код карцинома дојке супримира маркере матичности као што су OCT-4, NANOG, ABCB1, и ALDH1A1 (Amjad и сар., 2022). Кемпферол је показао стимулативну активност на повећање експресије ZO-1 у ћелијама CRC-а, па на тај начин утиче на очување интегритета интестиналне баријере и међућелијских веза у епителу (Ram и Vairappan, 2022).

Синапинска киселина је идентификована као један од врло заступљених флавоноида у узорку ММ-а који смо испитивали у овој студији, са концентрацијом од 7,47 $\mu\text{g/mL}$. Ова компонента је још један од врло значајних флавоноида који има способност да инхибира значајно експресију ЕМТ протеина (виментина, SNAIL-а и MMP-ова) у карциномским ћелијама, истовремено повећавајући експресију епителног маркера Е-кадхерина (Ероğlu и сар., 2018; Huang и сар. 2021).

Додатни ефекат флавоноида се огледа и у чињеници да ове супстанце модулирају састав интестиналне флоре, односно микробиома, за који је познато да је у великој мери одговоран за настанак CRC-а (Bu и сар., 2023).

На основу свега изнетог, можемо закључити да је тестирани узорак ММ-а богат флавоноидима, који поседују антимигранторна и антиинвазивна својства, како на имортализованим тако и на примарним ћелијским културама.

Стога, можемо закључити да горе наведена својства ММ-а у многоне зависе и од фенолног профила и биоактивних фенолних компоненти које су детектоване у врло високим концентрацијама.

Карактеризација млеча на основу концентрације киселине 10H2DA

Очигледно је да, на основу хемијске карактеризације ММ-а, односно одређивања профила фенолних компоненти које улазе у његов састав, овај природни производ своја значајна дејства на ћелије колоректалног карцинома дугује флавоноидима који су детектовани у врло високим концентрацијама, а већ се одликују запаженим ефектима на канцер.

Међутим, поред фенолних једињења која поседује ММ у високим концентрацијама и која су са једне стране одговорна за његове ефекте на канцер, његови позитивни антиканцерски ефекти везани су такође и за дејства незасићене масне киселине 10H2DA. Ова масна киселина је у великој мери заслужна за супримирање миграције, инвазије и метастатске активности на карциномским модел системима (Townsend и сар., 1960; Khazaei и сар., 2017; Miyata и Sakai 2018).

У том смислу, и садржај ове киселине у нашем узорку ММ-а је одређиван HPLC методом, и утврђено је да је њена концентрација износила $9,22 \pm 0,02$ mg по граму ММ-а, односно 0,92%.

Од свих 94 слободних масних киселина које су присутне у млечу, најзаступљенија је 10H2DA (Ramadan и Ahmed Al-Ghamdi, 2012), и према литературним подацима, садржина ове киселине у испитиваним узорцима ММ-а у свету врло варира, као што је приказано у **Табели 6**.

Табела 6. Процентуална заступљеност 10H2DA у узорцима ММ-а широм света.

Земља порекла ММ-а	10H2DA (%)	Референца
Грчка	0,8-6,5	Kanelis и сар., 2015
Румунија	0,75-3,8	Marghitas и сар., 2013
Италија	0,8-3,2	Feroli и сар., 2007
Турска	1,4-3,7	Genc и Aslan, 1999
Кина	1,26-2,21	Zhou и сар., 2007
Тајланд	0,82	Wytrychowski и сар., 2013
Бразил	1,58-3,10	Garcia-Amoedo и de Almeida-Muradian, 2003

Из приложеног се може видети да је концентрација киселине 10H2DA у испитиваном узорку ММ-а у оквиру опсега детектованих вредности за земље региона и сличне географске позиције. Ако упоредимо узорке из Грчке, Румуније или Италије можемо закључити да узорак из Србије одговара просечној процентуалној заступљеност 10H2DA у ММ-у. Треба имати у виду да је у оквиру ове студије анализиран само један узорак млеча, што не значи да се концентрација 10H2DA не би разликовала у другим узорцима млеча прикупљеним на територији Србије.

Обзиром да је само присуство, и количина детектоване киселине 10H2DA показатељ квалитета ММ-а, можемо констатовати да је наш узорак млеча доброг квалитета, што уз високу концентрацију флавоноида сврстава овај узорак у квалитетан пчелињи производ.

Механизми деловања ММ-а и 10H2DA

Цитотоксичност

ММ је пчелињи производ који је у току протеклих шест деценија показао значајне ефекте на раст, развој и прогресију различитих типова канцера у *in vivo* и *in vitro* условима (Nakaya и сар., 2007; Borawska и сар., 2014; Filipić и сар., 2015; Abandansari и сар., 2018; Miyata и Sakai, 2018). Међутим, студије које се тичу ефеката ММ-а на ћелијама колоректалног карцинома, HCT-116 и SW-480, до сада нема. Што се овог типа карцинома тиче, антипролиферативна активност ММ-а и то концентрација од 10 mg/mL, је показана на CaCo2 ћелијама колоректалног аденокарцинома (Filipić и сар., 2015). Антипролиферативни ефекти ММ-а у *in vitro* условима су потврђени и на ћелијским линијама различитих типова канцера, као што су: карцином дојке (MCF-7), простате (PC3) и глиобластома (U87MG) (Nakaya и сар., 2007; Borawska и сар., 2014; Abandansari и сар., 2018; Miyata и Sakai, 2018). У овим студијама, тестиране концентрације ММ-а на

антипролиферативни/цитотоксични ефекат су износиле више од 10 mg/mL, што је далеко веће од највише апликоване концентрације тестираног узорка ММ-а у овој студији, која је била 500 µg/mL. Такође, ефекат ММ-а је испитиван на ћелијској линији карцинома дојке (MCF-7) и простате (PC-3) у концентрацијама до 640 µg/mL, и није утицао на вијабилност ових ћелија (Аyna и Darendelioglu, 2022). Обзиром на то, тестирани узорак ММ-а у свим примењеним концентрацијама (1-500 µg/mL) није испољио значајно цитотоксично дејство на испитиваним ћелијским линијама колоректалног карцинома, што је било и очекивано и у потпуности је у сагласности са поменутих резултатима претходних студија.

Углавном се антипролиферативно/цитотоксично дејство ММ-а приписује његовој протеинској или липидној фракцији у коју спада киселина 10H2DA (Filipiћ и сар., 2015). Интересантно је да ова киселина не испољава цитотоксично дејство на ћелије различитих типова канцера у *in vitro* условима. Међутим, студије које су изводили Townsend и сар. (1960) су демонстрирале да, уколико се ова киселина (концентрације 1 mg/mL) помеша са ћелијама лимфосаркома или карцинома дојке пре инокулације у мишеве, не долази до формирања тумора. *In vitro* студије ове липидне компоненте млека су показале значајне цитотоксичне ефекте (са IC₅₀ вредностима) на ћелијама колоректалног карцинома (WiDr), али тек у концентрацијама већим од 3 mM (Yang и сар., 2018). Такође је цитотоксичне ефекте испољила и на ћелијама карцинома плућа, и то у концентрацијама мањим од 45 µM (Lin и сар., 2020), преко повећања ROS концентрација и утицајем на MAPK, STAT3, и NF-κB сигналне путеве. Са друге стране, многе студије указују на врло слаб или никакав утицај ове киселине на вијабилност ћелијских линија различитих типова канцера, као што су: карцином дојке (MCF-7) или цервикса (HeLa), у концентрацијама нижим од 1000 µM (Suzuki и сар., 2007; Moutsatsou и сар., 2010), меланома (B16F10), чак и у концентрацији 1 mM (Peng и сар., 2017). Обзиром да 10H2DA у нашим истраживањима није показала значајан цитотоксични ефекат на тестираним SW-480 и HCT-116 ћелијским линијама колоректалног карцинома, као ни на узорцима ткива добијеним од пацијената, можемо да закључимо да су наши резултати у складу са овим већ претходно публикованим резултатима ефеката киселине на осталим типовима канцера.

Антимиграторни потенцијал

Многе студије су потврдиле значајан супресивни ефекат ММ-а на раст карциномских ћелија и формирање метастаза у *in vivo* модел системима (Townsend и сар., 1960; Khazaei и сар., 2017; Miyata и Sakai 2018). Пре шест деценија је први пут показано инхибиторно дејство млека на развој трансплантиране леукемије у модел систему миша (Townsend и сар., 1959). Такође је демонстрирано кроз неколико студија да млеко значајно инхибира формирање тумора, успорава раст неких типова тумора, спречава настанак метастаза и позитивно утиче на успешно преживљавање ових *in vivo* модел система (Tamura и сар., 1987; Bincoletto и сар.,

2005; Orsolić и сар., 2005; Sugiyama и сар., 2012; Shirzad и сар., 2013). Уочена је редукција величине тумора под дејством млеча за око 50%, а животни век *in vivo* модел система продужен за око 20% (Shirzad и сар., 2013). Овакви ефекти ММ-а су значајни за детаљније испитивање механизма дејства овог природног производа. Међутим, ефекти ММ-а и 10H2DA на миграторни и инвазивни потенцијал ћелија колоректалног карцинома нису до сада познати, а још мање тачни молекуларни механизми дејства.

Наша испитивања по први пут показују инхибиторна дејства ММ-а и 10H2DA на миграторни/инвазивни потенцијал две имортализоване ћелијске линије колоректалног карцинома. Ове ћелијске линије (SW-480 и HCT-116) су циљано одабране јер воде порекло из различитих стадијума CRC-а. Наиме, SW-480 ћелије су изоловане из II стадијума ове болести, па су добар пример почетног стадијума CRC-а (Jiang и сар., 2012; Šeklić и сар., 2022). SW-480 су окарактерисане као умерено диференциране, више епителне морфологије и са слабијим ЕМТ одликама. Код ових ћелија се уочава раст у кластерима, слаб мотилитет и колективни тип миграције (Nietzer и сар., 2016; Šeklić и сар., 2016; Liu и сар., 2016; Šeklić и сар., 2022).

За разлику од њих, HCT-116 је изабрана као репрезент напредног стадијума јер је изолована из IV стадијума CRC-а. Ове ћелије су слабо диференциране, мезенхимског фенотипа, у напреднијој ЕМТ фази, уочене као веома агресивне са веома јаким инвазивним и миграторним карактеристикама. У ћелијској култури не образују изразите кластере, а мигрирају индивидуално, односно у виду појединачних ћелија (Nietzer и сар., 2016; Šeklić и сар., 2016; Liu и сар., 2016; Šeklić и сар., 2022).

Тестиране ћелијске линије се разликују и по мутацијама у важним генима Wnt/ β -катенин сигналног пута, APC или самог β -катенина. SW-480 ћелијска линија носи мутацију у APC гену, па је деградација β -катенина у великој мери смањена и резултује акумулацијом овог протеина у цитоплазми ћелија, одакле транслоцира у нуклеус где преузима улогу транскрипционог фактора. Код HCT-116 ћелијске линије је β -катенин тај који је мутиран, али тако да је његова деградација од стране протеолитичких ензима онемогућена (Šeklić и сар., 2018).

Ова истраживања стављају у фокус различит тип миграције којим се ове две тестиране имортализоване ћелијске линије користе, који је у корелацији са степеном ЕМТ-а који је у њима присутан. Наведени процеси су окарактерисани типичним ЕМТ маркерима.

У оквиру ове дисертације први пут је показана разлика у типу миграције код испитиваних ћелијских линија, при чему су SW-480 ћелије окарактерисане као колективно мигрирајуће.

Код SW-480 ћелијске линије испољен је колективни начин миграције, при чему ове ћелије формирају миграторни фронт у чијем челу се налазе лидер ћелије које предводе остатак ћелијске групације. Добијени резултати указују да је у овим ћелијама уочена виша експресија Е- кадхерина, врло високи ниво цитоплазматског

β -катенина и низак ниво нуклеарног β -катенина, што корелира са очувањем међућелијских веза у колективној миграцији. Уједно на тестовима за појединачну миграцију ове ћелије су показале низак ниво мотилитета, што корелира са специфичношћу есеја да кроз поре не могу проћи кластери. Анализом експресије ЕМТ-маркера запажена је експресија промигранторних/инвазивних и про-ЕМТ маркера: N-кадхерина, SNAIL-а, виментина и α -SMA. Све ово указује да SW-480 ћелије користе колективну миграцију као тип кретања, али да имају агресивни потенцијал који карактеришу про-ЕМТ маркери (Kim и сар., 2019). Овај тип миграције сматра се изузетно софистицираним обзиром да ћелије пролазе кроз делимичан ЕМТ процес задржавајући се у различитим ЕМТ прелазним стадијумима. Ови фенотипски прелазни стадијуми ЕМТ-а у којима се могу наћи ћелије, у стању су да процене повољности услова микроокружења за захтевне процесе као што су миграција и инвазија. Ове ћелије могу „лако” прећи више у епител уколико услови за миграцију нису повољни, што ће им омогућити преживљавање, пролиферацију, секреторну или дормантну улогу. Променом услова у микроокружењу ове ћелије прелазе више у мезенхимски фенотип што ће кластеру омогућити миграцију и инвазију. Ћелије се из кластера могу издвојити и наставити миграцију као појединачне, што додатно компликује овако сложену проблематику ћелијског кретања. Познато је да свака ћелија унутар кластера има своју улогу што чини ове туморе веома прилагодљивим новонасталим условима, а у том смислу и веома одрживим. Такође је познато да ћелије у кластерима лакше преживљавају сурове услове у окружењу (Pijuan и сар., 2019). Према нашим истраживањима, у SW-480 ћелијама SNAIL представља главни регулатор кретања, испољавајући дејство преко појачане стимулације ефекторних протеина N-кадхерина, виментина, α -SMA и цитоплазматског β -катенина са улогом везивања за ћелијски цитоскелет (Kim и сар., 2019).

Са друге стране, код миграције НСТ-116 ћелија није опажено формирање миграторног/инвазивног фронта, већ ове ћелије испољавају индивидуални тип миграције, односно уочене су појединачне мигрирајуће ћелије. Такође, контролне (нетретиране) НСТ-116 ћелије су испољиле интензивнији мотилитет у односу на SW-480 ћелије, што указује да се ове ћелије генерално брже крећу. Индивидуална миграција карактеристична је за појединачне ћелије и напредне стадијуме CRC-а, што је већ показано у ранијим истраживањима (Šeklić и сар., 2022). НСТ-116 ћелије се одликују много вишим нивоима нуклеарног β -катенина и SNAIL-а, као кључним регулаторима миграције/инвазије и ЕМТ-а, а ниво експресије ефекторних протеина ЕМТ-а је базално већи него у SW-480 ћелијама. Све наведено указује да је у овим ћелијама ЕМТ процес веома унапредовао и да долази до изразите супресије епителних маркера и експресије мезенхимских протеина који омогућавају карциномској ћелији фибробласту-сличан издужен облик. Интензивни мотилитет НСТ-116 ћелија, према нашим истраживањима, је под регулацијом SNAIL-а, а значајно доприноси и нуклеарни β -катенин, под чијом контролом такође стоји

експресија промиграторних/инвазивних маркера. Ови регулаторни маркери, сваки за себе или у корегулацији, доприносе узнатредовалом ЕМТ процесу у НСТ-116 ћелијама. Познато је да је индивидуална миграција агресивнији и бржи тип ћелијске миграције, а према нашим истраживањима, испитивани третмани су показали изражајније ефекте на овај тип миграције о чему ће бити речи у наставку.

Ове две ћелијске линије су показале разлике и у испољеној инвазивности, па су тако нетретирани НСТ-116 ћелије имале јачи инвазивни потенцијал у поређењу са SW-480 ћелијама.

На основу изнетог можемо закључити да је присуство ЕМТ процеса евидентно у испитиваним SW-480 и НСТ-116 ћелијским линијама и његов интензитет је у складу са стадијумима из којих су ове ћелије и изоловане, као и типом миграције којима се користе. Очигледно слабији ЕМТ уочен у SW-480 ћелијама корелира са II стадијумом из ког су ове ћелије изоловане, али и са колективним типом миграције. Интензивнији ЕМТ дефинисан код НСТ-116 ћелија је карактеристичан за напредне стадијуме и корелира са IV стадијумом и појединачним типом миграције којим се ове ћелије служе.

Што се тиче стања матичности у овим имортализованим линијама, употребом маркера NANOG и ALDH1B1 је на протеинском нивоу детектовано присуство SW-480 и НСТ-116 ћелија са одликама матичности. Анализом смо утврдили да је ниво регулаторног транскрипционог фактора NANOG-а у SW-480 ћелијама на знатно вишем нивоу, док је ефекторни маркер, цитоплазматски ензим ALDH1B1 уочен на нижем нивоу у овим ћелијама, у поређењу са НСТ-116 ћелијском линијом. Овакав однос у експресији регулаторног и ефекторног маркера указује на интензивније регулаторне процесе матичности у SW-480 ћелијама, док су метаболички процеси матичног стања слабијег интензитета. Насупрот томе, у НСТ-116 ћелијама обрнута ситуација имплицира слабију регулацију матичности, и интензивнији метаболизам код НСТ-116 ћелија. На основу експресије испитиваних маркера матичности очигледно је да је стање матичности у испитиваним ћелијским линијама присутно. Обзиром да ALDH1B1 учествује у стварању ретиноинске киселине која промовише, тј. стимулише стање матичности (Singh и сар., 2015), на основу добијених резултата можемо закључити да НСТ-116 ћелије имају више изражен метаболизам матичности што корелира са узнатредовалим стадијумом ЕМТ-а у овој ћелијској линији.

У складу са различитим одликама ЕМТ-а и матичности, тестиране ћелијске линије су одговорице на третмане ММ-ом и киселином 10H2DA, при чему је 10H2DA испољила значајније дејство.

У погледу ефеката третмана на миграторни потенцијал SW-480 и НСТ-116 ћелија, уочавају се разлике у дејству на колективни и индивидуални тип миграције. Обзиром да се SW-480 ћелијска линија користи колективним типом миграције, оба третмана су супримирали овај процес, а киселина 10H2DA је била успешнија у томе.

Додатно, и инвазивни потенцијал SW-480 ћелија је такође успешније супримиран 10H2DA третманом.

Ефикасност испитиваних третмана на супресију миграторног и инвазивног потенцијала HCT-116 ћелија је такође уочена. Ови процеси су заустављени под утицајем оба третмана, међу којима је 10H2DA инхибирала миграцију, како на индивидуалном тако и на колективном нивоу, заједно са инвазијом. У одговору на третман је уочена већа осетљивост HCT-116 ћелија, што није новина, обзиром да је ова линија осетљива на примену природних производа, како је раније и показано (Šeklić и сар., 2016; Šeklić и сар., 2018; Šeklić и сар., 2022).

EMT је главни догађај који карциномским ћелијама омогућава стицање инвазивног потенцијала, у првом кораку доводи до деструкције Е-кадхерин/ β -катенин мембранског комплекса, одговорног за успостављање међућелијских веза (Loх и сар., 2019). Ослобађањем β -катенина из комплекса, омогућава се његова акумулација у цитоплазми, а затим и транслоцирање у једро где директно инхибира експресију Е-кадхерина. Нуклеарни β -катенин стимулише експресију мезехималних маркера N-кадхерина, виментина, SNAIL-а и MMP-а, чиме знатно утиче на појачање миграторних и инвазивних способности карциномских ћелија (Kim и сар., 2019). Током метастазирања CRC-а, Е-кадхерин бива значајно супримиран у ћелијама инвазивног фронта, док је β -катенин изразито акумулиран у нуклеусима ових ћелија (Wang и сар., 2013).

Обзиром да је киселина имала изражен антимиграторни/антиинвазивни ефекат можемо закључити да јемеханизам дејства овог третмана у SW-480 ћелијама био преко смањења промиграторних/проинвазивних маркера, што је довело до повећања Е-кадхерина на генском нивоу. Значајно смањење SNAIL-а које је детектовано на генском и протеинском нивоу, као главног регулатора EMT-а са улогом у контроли експресије промиграторних/проинвазивних протеина, доводи до смањења N-кадхерина, виментина и α -SMA у третираним SW-480 ћелијама. Познато је да SNAIL индукује и повећање експресије и секреције различитих типова MMP-а, па је смањење његове експресије индуковало антиинвазивно дејство третмана.

Детаљан молекуларни механзам у колоректалном карциному у третману 10H2DA до сада није испитиван. Слични ефекти киселине показани су у претходним студијама на другим типовима канцера (Lin и сар., 2020). У основи супресије миграторног потенцијала је повећање Е-кадхерина и супресије N-кадхерина, виментина и SNAIL-а (Lin и сар., 2020). Познато је и да други пчелињи производи, као што је мелитин, главна компонента пчелињег отрова, може да снизи ниво β -катенина и истовремено да утиче на повећање Е-кадхерина у ћелијама карцинома панкреаса (Wang и сар., 2018). Мелитин је успешан и у повећању Е-кадхерина у ћелијама карцинома јетре (Chen и сар., 2019).

Резултати показују да је третман индуковао смањење цитоплазматског и повећање нуклеарног пула β -катенина у SW-480 ћелијама, што говори у прилог

чињеници да је могућа транслокација β -катенина из цитоплазме у нуклеус. Обзиром на повећање експресије Е-кадхерина на генском нивоу у овим третираним ћелијама, као и смањење експресије β -катенина, можемо закључити да је он укључен у процесе који нису у основи миграције и инвазије.

У НСТ-116 ћелијској линији третман киселином је довео до значајног повећања цитоплазматског β -катенина, и смањења нуклеарног β -катенина, што је заједно са смањеним SNAIL-ом утицало на значајно смањење нивоа промигранторних/проинвазивних протеина N-кадхерина, виментина и α -SMA у НСТ-116 ћелијама.

Смањена експресија SNAIL-а на генском и протеинском нивоу је уз смањење експресије β -катенина индуковало повећање нивоа Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама, што је за последицу имало повећан ниво Е-кадхерина и цитоплазматског β -катенина. Овиме се објашњава успостављање мембранског комплекса Е-кадхерин/ β -катенин чиме се учвршћују међућелијске веза, што је у корелацији са редукцијом ЕМТ-а у овим ћелијама и антимигранторним ефектима третмана. Смањена експресија SNAIL-а стоји у основи појачане експресије Е-кадхерина, што коначно резултира смањењем MMP-а и води слабијем инвазивном потенцијалу испитиваних ћелија (Song и сар., 2019).

Код ћелија са израженим мотилитетом, као што су НСТ-116, уколико експресија трансмембранског протеина N-кадхерина постане абнормално интензивна, долази до олакшане дисеминације ћелија са примарног локалитета. Истовремено, у карциономским ћелијама се дешава „кадхерински прекидач” који индукује опадање нивоа Е-кадхерина чиме је ниво Е-кадхерина додатно смањен (Loh и сар., 2019; Lupinacci и сар., 2019). Антимигранторни и антиинвазивни ефекти третмана MM-а и киселине 10H2DA су очигледно били последица значајне супресије регулаторног маркера SNAIL-а, а последично и N-кадхерина, виментина, како на генском тако и на протеинском нивоу у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.

Смањење нивоа експресије N-кадхерина и виментина у карциономским ћелијама је такође уочено и под дејством пчелињег производа мелитина (Wang и сар., 2018; Chen и сар., 2019), што указује на способност пчелињих производа да генерално утичу на регулацију генске и протеинске експресије ових маркера.

Супресивни ефекат је 10H2DA испољила на регулаторне маркере матичности код SW-480 и НСТ-116 ћелија. Код НСТ-116 ћелија додатно је снижен и ефекторни ензим ALDH1B1, што указује на потпуну инхибицију матичности код ових ћелија као репрезента напреднијег стадијума CRC-а. Са друге стране, у SW-480 ћелијама, ALDH1B1 је повећан, па можемо закључити да је третман својом активношћу индиректно утицао на одржавање матичности и пролиферативну активност SW-480 ћелија. Литература показује да у ћелијским линијама CRC-а различити третмани могу изазвати повећање овог маркера (Korpenhaaver и сар., 2021). Такође, овај маркер игра круцијалну улогу у антиоксидативној заштити ћелија (Tsochantaridis и сар., 2023), па је могуће да је третман киселином изазвао

повећање овог ензима у циљу заштите од оксидативног оштећења у SW-480 ћелијама.

Ефекти киселине на испитиване ћелијске линије се могу објаснити врло јаким афинитетом који 10H2DA има за везивање за естрогене рецепторе β (енгл. *Estrogen receptor β* - ER β), унутар ћелија које их експримирају. Спој ове киселине и рецептора узрокује активацију истог чиме се иницира његово кретање до нуклеуса где се везује за промоторске регионе гена означене као естроген-одговарајуће секвенце (енгл. *Estrogen response element* - ERE) на ДНК молекулу (Suzuki и сар., 2008). Неколико студија је потврдило да ова киселина 10H2DA активира ER β (Mishima и сар., 2005; Suzuki и сар., 2008; Moutsatsou и сар., 2010), преко кога се регулише експресија разичитих гена, међу које спадају: Е-кадхерин, N-кадхерин, β -катенин, виментин и SNAIL (Suzuki и сар., 2008). Присуство и преминација овог типа рецептора (Er β) је одговорна за регулацију одржавања епителног фенотипа, а његово присуство потврђено је у CRC-у и у испитиваним ћелијским линијама (Caiazza и сар., 2015; Williams и сар., 2016; di Zazzo и сар., 2019). ER β учествује и у регулацији матичног стања карциномских ћелија и многе студије су потврдиле да активација овог рецептора инхибира матично стање карциномских ћелија *in vivo* (Chen и сар., 2020).

Механизам деловања испитиваног третмана на примарној ћелијској култури

У овој студији су анализирани и ткивни узорци добијени од пацијената оболелих од CRC-а са аспекта фенотипизације, регулације фенотипова испитивањем експресије регулатора EMT-а и матичности, као и детекције најагресивнијег фенотипа. Карциномска ткива добијена од пацијената са I и II стадијумом CRC-а су груписана као почетни стадијум, док су ткива добијена од пацијената са III и IV стадијумом CRC-а груписана као напредни стадијум. Оваква категоризација ткива је спроведена ради поређења са одабраним испитиваним имортализованим ћелијским линијама на којима су истраживања рађена. Пацијенти од којих су ткивни узорци добијени припадају различитим старосним добима и различитог су пола. Према клиничко-патолошким карактеристикама, ткивни узорци су средње или добро диферентовани, инвазивних одлика, што имплицира висок ниво агресивности CRC-а из којих су добијени.

Изолација примарне ћелијске културе из ткивних узорака, је као што је већ напоменуто, врло комплексан и захтеван процес. Ово нарочито важи за узорке који се добијају од пацијената са CRC-ом, с обзиром да су рани покушаји успостављања примарних ћелијских култура хуманог колоректалног карцинома имали слаб успех. Као најчешћи проблеми јављају се микробиолошка контаминација и комплексни нутритивни захтеви изолованих ћелија. Ови проблеми су делимично превазиђени појачаном употребом антибиотика и адаптацијом састава медијума, међутим временски оквир њихове вијабилности и даље представља велики

проблем. Овакве културе ћелија се врло кратко могу одржавати. Након свега један до два пасажа, вијабилност примарних ћелијских линија драстично опада. Различити приступи за изолацију и култивацију хуманих ћелија канцера колона су до сада предложени (Failli и сар., 2009; Ali и сар., 2015), а уз примену и комбиновање предложених протокола, примарна ћелијска култура је у овој студији успешно успостављена из врло мало узорака. Применом комбинације механичке и ензимске деградације само узорци напредних (IV) стадијума су дали задовољавајуће резултате.

Морфолошке одлике ћелија су детерминисане микроскопском методом, при чему је уочен велики проценат епителних ћелија плочасте морфологије, док је проценат ћелија мезенхимског фенотипа био мање заступљен. Ове ћелије одликује вретенаста морфологија која је карактеристична за фибробласте.

У овој студији, ћелије изоловане из узорака ткива, окарактерисане су фенотипски и на протеинском и генском нивоу.

Контролни почетни стадијум

На основу клиничко-патолошких карактеристика анализираних узорака CRC-а добијених од оболелих пацијената, 50% узорака је имало одлике почетног стадијума. Од свих испитиваних узорака, 50% њих је окарактерисано као инвазивни аденокарцином, док остатак чине интрамукозални и муцинозни аденокарцином. Интрамукозални аденокарцином представља најранију форму инвазивног аденокарцинома где су карциномске ћелије пробиле слој *lamina propria* (MacDonald и сар., 2009), смештен испод епитела, а у којој се налазе крвни судови. Обзиром на то да су карциномске ћелије дошле до овог слоја, имају олакшан приступ крвотоку путем ког метастазирање отпочиње. Са друге стране, муцинозни аденокарцином је тип аденокарцинома где више од 50% туморске масе чини екстрацелуларни муцин са груписаним или индивидуалним карциномским ћелијама (Benesch и Mathieson, 2020). Овај хистолошки тип CRC-а се карактерише јаким инвазивним потенцијалом и појачаном пролиферацијом (Zhang и сар., 2022). На основу свега изнетог може се закључити да су сви добијени узорци CRC-а врло инвазивне природе са јаким потенцијалом за метастазирање и стога врло подесни за анализу.

Према резултатима фенотипизације, у почетним стадијумима су детектована сва три типа ћелија: епителне, мезенхимске и матичне ћелије. Све три популације ћелија биле су процентуално заступљене, при чему је највећи проценат припадао ћелијама са матичним одликама тј. матичног фенотипа, затим епителног, а најмање мезенхимског. Према литератури, матичне ћелије заузимају мали проценат карциномског ткива (Singh и сар., 2003; Pavon и сар., 2014; Cabrera и сар., 2015; Sreepadmanabh и Toley, 2018; Rossi и сар., 2020), међутим наши резултати указују на велику процентуалну заступљеност ћелија са овим маркерима. Овакав велики проценат ћелија са матичним маркерима указује да од

овог стадијума можемо очекивати јак карциномски потенцијал и интензивну прогресију.

У овом истраживању, у узорцима ткива, испитивани су маркери матичности: NANOG, ALDH1B1 на протеинском, и KLF4 и OCT3/4 на генском нивоу. Добијени резултати у узорцима почетног стадијумима су упоређени са резултатима добијеним код SW-480 ћелија. Ћелије које су окарактерисане као ћелије са матичним одликама показале су позитивну протеинску експресију маркера NANOG и ALDH1B1 што указује да велики део узорка чине ћелија које имају испољен и регулаторни и ефекторни маркер матичности. Такође, експресија KLF4 и OCT3/4 је потврђена код дела популације ћелија изолованих из узорка почетног стадијума. Наша испитивања указују на присуство популације ћелија са јасним матичним одликама и са уделом од ~30%. Литературни подаци тврде да је популација ових ћелија умногоме редукована код имортализованих ћелијских линија (Richter и сар., 2021), док наша испитивања указују на присуство ове популације и у њима, са уделом од ~25-50%. Ово потврђује хипотезу да су ћелије са матичним маркерима присутне у почетним стадијумима CRC-а и да има смисла испитивати их.

Повећање NANOG маркера матичности детектовано је у почетном стадијуму у примарној култури, али и у имортализованој ћелијској линији почетног стадијума (SW-480), што указује да је регулаторни маркер матичности заступљен у 50% популације испитаних имортализованих SW-480 ћелија које су у почетним стадијумима. За разлику од њега, ефекторни маркер ALDH1B1 је детектован у 25% популације у SW-480 ћелијама, а присутан је и у примарној ћелијској култури. Познато је да NANOG блиско интерагује са комплексом β -катенин/TCF/LEF чиме учествује у регулацији судбине ћелија, или у смислу пролиферације, или у смислу иницијације ЕМТ-а (He и сар., 2023). Очигледно је да судбина ћелија у смислу прогресије зависи од сублимације унутрашњих и спољашњих фактора и последица које они изазивају у њој.

Експресија транскрипционих фактора OCT3/4 и KLF4 је у примарној ћелијској култури детектована на генском нивоу, а вредности су знатно ниже у поређењу са напредним стадијумима што корелира са стадијумом ЕМТ-а и агресивношћу тумора. У почетном стадијуму је уочен знатно виши ниво експресије KLF4 регулатора. На основу добијених резултата можемо закључити да међу одабраним маркерима OCT3/4 и KLF4, значајнију улогу има KLF4 транскрипциони фактор који уз NANOG представља маркер матичног стања ћелија изолованих из почетних стадијума. KLF4 има регулаторну улогу у CRC-у, кључни је регулатор диференцијације епителних ћелија преко активације гена чији су протеински продукти маркери епителног фенотипа.

Познато је да KLF4 у канцеру може бити окарактерисан као тумор супресор, али и онкогени маркер. Студије наводе да је KLF4 тумор супресор у CRC-у, а уколико дође до његове дефицијенције, прогресија ове болести бива убрзана (He и сар., 2023).

Све ово говори у прилог да су ћелије са матичним одликама почетног стадијума окарактерисане преко NANOG-а, а индукују стварање ћелија епителног фенотипа преко KLF4. На основу овога можемо констатовати да су матичне ћелије почетних стадијума усмерене на пролиферацију стварајући велики број епителних ћелија.

У контролним узорцима пацијената почетног стадијума су детектовани главни регулаторни маркери EMT-а, *SLUG* и *SNAIL*, што указује на то да је у нашем узорку детектован EMT. Такође, на основу високе експресије испитиваних маркера EMT-а у имортализованој SW-480 ћелијској линији закључујемо да је EMT присутан. Резултати добијени на имортализованој ћелијској линији корелирају са резултатима добијеним на примарној ћелијској култури, што дефинитивно указује на присуство EMT-а у почетним стадијумима CRC-а.

Коначно можемо закључити да су у почетним стадијумима присутне матичне ћелије окарактерисане преко присуства NANOG-а и KLF4, као и да су присутни регулаторни маркери EMT-а. Епителни и мезенхимски фенотип окарактерисани су на основу предложене комбинације маркера у заступљености 20%, односно 15% популације ћелија. Ови подаци су у сагласности са добијеним резултатима на SW-480 ћелијској линији која поседује матичне одлике, епителног је фенотипа, са слабије унапредовалим EMT-ом.

Имајући у виду да је групација пацијената почетних стадијума хетерогена, и да у њу спадају I и II фаза различитих клинички описаних специфичних карактеристика (пол, старост, стадијум, мутације, итд.), а код имортализованих линија испитивања су вршена само на једној ћелијској линији овог стадијума, истичемо потребу за анализама на више ћелијских линија које описују почетне стадијуме.

На основу комбинације маркера ZO-1/виментин/NANOG, коришћених за карактеризацију најагресивнијег фенотипа у популацији епителних ћелија примарне културе, уочено је присуство овог фенотипа и у почетним стадијумима. Најагресивнији фенотип је мање заступљен него у напредним стадијумима, али се никако не сме занемарити у смислу анализе и даљег праћења.

С обзиром да су ово прелиминарна истраживања, као и да је у оквиру ове студије испитана одређена комбинација маркера, све изнесено указује на потребу анализе и праћења већег броја маркера, на генском и на протеинском нивоу. Такође, потребно је све ово анализирати код сваког пацијента како би сваки узорак могао бити детаљно окарактерисан ради јаснијег груписања пацијената.

Контролни напредни стадијум

У контролним узорцима напредних стадијума су детектована сва три испитивана фенотипа ћелија. Према процентуалној заступљености, највише је било матичних, затим епителних, а највећа разлика у односу на почетни стадијум је уочена у погледу присуства мезенхимског фенотипа, који је у овом стадијуму

редукован. У односу на почетни стадијум, виши проценат присуства матичних ћелија је и очекиван, обзиром да се напредни стадијуми карактеришу већом агресивношћу која потиче од овог типа ћелија. У складу са тим, повећани маркери су NANOG и ALDH1B1, на основу којих је овај фенотип и детектован. KLF4 је главни транскрипциони фактор који директно регулише експресију NANOG-а. KLF4 се директно везује за OCT3/4 чиме се формира комплекс који везивањем за ДНК, конкретно промоторске секвенце NANOG-а, стимулише експресију овог гена и тиме долази до повећања нивоа NANOG-а, што је кључно за одржавање матичног стања (Zhang и сар., 2010). NANOG је такође окарактерисан и као један од фактора који активно стимулише агресивно понашање канцера у смислу повећања миграторног потенцијала и EMT-а (Jeter и сар., 2015). Према литератури, NANOG, OCT3/4 и SLUG су транскрипциони фактори који су у канцеру у тесној вези, и супресија NANOG/OCT3/4 сигналинга последично води инхибицији експресије SLUG-а чиме се значајно супримира метастатски потенцијал (Jeter и сар., 2015).

У овој ћелијској популацији, ниво *SLUG*-а је на знатно вишем нивоу у напредном стадијуму, када вредности поредимо са почетним стадијумом, док је ниво *SNAIL*-а знатно нижи у односу на почетни стадијум. Обзиром да литература показује да се ова два маркера међусобно корегулишу, можемо закључити да је повећан ниво *SLUG*-а у основи регулације и повећања експресије *SNAIL*-а. На основу добијених резултата, *SLUG* представља очигледно значајнији фактор, јер стоји у основи регулације експресије *SNAIL*-а, док *SNAIL* служи као изванредан ефектор у регулацији ћелијских фенотипова у основи којих стоји EMT процес. У HCT-116 ћелијама је *SNAIL* био појачано експримиран, што указује да је у имортализованим линијама изолованим из напредних стадијума овај маркер регулатор детектованог узнапредовалог EMT процеса. Овиме можемо закључити да је EMT присутан и у имортализованим и у примарним ћелијским културама. У том смислу, указујемо на неопходност испитивања и других регулаторних фактора у каскади регулације EMT-а, као што су ZEB, TWIST, β -катенин итд, у примарним културама.

У карактеризацији епителног фенотипа је у овој студији коришћен и маркер ЕрCAM, и познато је да током прогресије канцера ниво експресије ЕрCAM-а расте. Овај маркер стимулише процесе пролиферације, ћелијског раста, ћелијског циклуса, дедиференцијацију епителних ћелија, матичност и EMT. ЕрCAM је углавном у негативној корелацији са EMT регулаторима SLUG-ом и SNAIL-ом, и појавом мезенхимског фенотипа (Kalantari и сар., 2022). Ове чињенице потврђују наше резултате обзиром да је у напредном стадијуму мезенхимска популација најмање заступљена, а експресија SNAIL-а снижена, што корелира са повећаном експресијом ЕрCAM-а. Литературни подаци указују да појачана експресија ЕрCAM-а такође корелира са интензивним инвазивним/миграторним потенцијалом карциномских ћелија (Keller и сар., 2019). Обзиром да се ЕрCAM сматра и маркером матичних карциномских ћелија које воде порекло од епитела (Kalantari и сар., 2022), а у контролним узорцима напредног стадијума је експримиран у високим

нивоима, можемо закључити да учествује и у одржавању матичног фенотипа заједно са високо експримираним NANOG-ом. У том смислу, очигледно је да и овај маркер регулише агресивни фенотип ћелија напредног стадијума.

Наша истраживања показују да су нивои *KLF4* и *OCT3/4* регулатора матичности детектовани у повећаном нивоу у односу на почетни стадијум, а такође је и процентуална заступљеност матичног фенотипа повишена у односу на почетни стадијум. Самим тим, може се закључити да су ова два транскрипциона фактора очигледно одговорна за регулацију матичног фенотипа. Са друге стране, *KLF4* такође регулише и експресију *SLUG*-а (Lin и сар., 2012), а обзиром да је у нашем истраживању у напредном стадијуму ниво *SLUG*-а такође био повишен у односу на почетни стадијум, можемо потврдити корелацију наших истраживања са литературним подацима. Очигледно је да су испитивани регулатори матичног стања, *KLF4* и *OCT3/4*, у вези са регулатором ЕМТ-а *SLUG*-ом, и најзначајнији у регулацији степена агресивности канцера напредних стадијума испитиваних узорака CRC-а.

Најагресивнији фенотип, који смо окарактерисали према маркерима ZO-1, виментин и NANOG, је изразито присутан у популацији епителних ћелија напредног стадијума пацијената. У овој популацији епителних ћелија, детектовано је чак 14% ћелија које су позитивне на сва три маркера, и тиме су окарактерисане као ћелије са најагресивнијим фенотипом.

Познато је да се резистентност канцера на терапеутике јавља управо због матичних ћелија, а у великој мери агресивност малигнитета такође зависи од њиховог присуства. У епителним ћелијама, се међутим дешавају кључне малигне трансформације, мутације у сигналним путевима, специфичним молекулама. Управо су оне те које су одговорне за секрецију различитих цитокина, хемокина, фактора раста и других молекула којима утичу на своју околину мењајући је и прилагођавајући својим потребама. Такође се у њима догађа ЕМТ процес, али не до краја, па се налазе у стању делимичног преласка у мезенхимски фенотип, задржавајући у великој мери епителне карактеристике. Оваква делимична интерконверзија омогућава велику пластичност ћелија, што представља најопасније стање карциномских ћелија.

Анализа утицаја третмана на изоловану примарну културу

Изоловане ћелијске популације из ткивних узорака почетног стадијума CRC-а су показале осетљивост на третман киселином 10Н2ДА. Дошло је до очигледних разлика у одговору на две примењене концентрације које су испољиле различите ефекте на заступљеност појединачних фенотипова.

Нижa концентрација киселине, 10 μ М, је супримирала заступљеност свих испитиваних фенотипова почетног стадијума, у односу на контролу. Најзначајније смањење је уочено код процентуалне заступљености мезенхимских ћелија, а затим матичног, па епителног. Ова концентрација је смањила и ниво експресије *SNAIL*-а у

почетном стадијуму, док је експресија *SLUG*-а била повећана у односу на контролне вредности (нетретирани узорке).

Такође, дошло је и до смањења регулатора матичности *OCT3/4* и *KLF4* што корелира са резултатима смањене експресије *NANOG*-а и потврђено је резултатима смањене процентуалне заступљености матичног фенотипа.

На основу добијених резултата за нижу концентрацију третмана, можемо закључити да је имала извесно цитостатско дејство обзиром на смањење ових присутних популација, са посебним акцентом на смањење *OCT3/4*, *KLF4* као и *NANOG*-а. Са аспекта ЕМТ-а можемо закључити да је уочено смањење *SNAIL*-а и повећање *SLUG*-а, што говори у прилог значајности испитивања регулатора ЕМТ-а, а посебно *SLUG*-а.

Са друге стране, виша концентрација овог третмана је имала опозитни ефекат и изазвала је повећање процентуалне заступљености матичног и епителног фенотипа, и смањење мезенхимског фенотипа, у односу на контролу. Ово је и очекивано од почетног стадијума узимајући у обзир да је у њему значајно појачан процес пролиферације (Kaur и сар., 2012). Регулаторни маркер ЕМТ-а *SLUG* је био повећан, а *SNAIL* смањен, док су регулатори матичности *OCT3/4* и *KLF4* били повећани. Обзиром да су у већој концентрацији испољенији маркери ЕМТ-а у односу на нижу концентрацију, очигледно је да *SLUG* и *SNAIL* изазивају повећање маркера матичности *OCT3/4* и *KLF4*, што корелира са већом процентуалном заступљеношћу матичног и епителног фенотипа.

На основу свега изнетог, можемо констатовати да је у почетним стадијумима нижа концентрација довела до смањења фенотипског удела ћелија са одликама епитела, мезенхима и матичности, што уз смањење маркера ЕМТ-а и маркера матичности указује на бољи ефекат ниске дозе 10H2DA

Киселина 10H2DA је у обе концентрације испољила супресивно дејство на процентуалну заступљеност свих испитиваних фенотипова у ћелијској популацији напредног стадијума. Притом је нижа концентрација киселине ефикасније супримирала популацију епителних ћелија, преко смањења ЕрСАР-а и Е-кадхерина. Популација матичног фенотипа је такође смањена инхибицијом маркера *NANOG* и *ALDH1B1*. Очигледно је да су ЕрСАР и *NANOG*, као регулатори матичног и епителног фенотипа у тесној вези и делују синергистички у смислу регулације експресије ефекторних маркера епителних и матичних фенотипова, чак и под утицајем третмана.

Литературни подаци показују да ЕрСАР и *NANOG* појединачно регулишу стање матичности у ћелији (Zhang и сар., 2010; Kalantari и сар., 2022). Наши резултати показују да смањење овог фенотипа очигледно иде преко супресије ЕрСАР-а, *NANOG*-а и *KLF4*, што корелира са фенотипизацијом у третману нижом концентрацијом. Исти одговор на нижу концентрацију дали су и маркери ЕМТ-а, што значи да је овај третман деловао супримирајуће на регулацију ЕМТ-а. Обзиром на хетерогеност испитиваних узорака у смислу клиничких одлика очекивано је

неуклапање појединих параметара што је случај са маркером матичности *OCT3/4* у испитиваном третману.

Према добијеним резултатима за напредне стадијуме, можемо констатовати да је јаснији одговор ћелија на третман био у нижој концентрацији киселине где су сви маркери били оркестрирано снижени и на протеинском и на генском нивоу.

Очигледно је да већа концентрација третмана индукује другачији ћелијски одговор у примарној култури у оба испитивана стадијума, што указује да високе дозе овог третмана треба додатно анализирати на нивоу више протеинских и генских маркера за сваку испитивану популацију ћелија.

Према нашим резултатима, одговор напредног стадијума је био бољи на третман киселином 10H2DA, што је један од најзначајнијих резултата ове студије.

У оквиру будућих испитивања ће бити анализиран већи број пацијената употребом већег броја маркера ЕМТ-а и матичности.

Утицај третмана на најагресивнији фенотип

Агресивни фенотип окарактерисан је у популацији епителних ћелија. Циљ ове методе је био маркирање епителних ћелија са мезенхимским карактеристикама и одликама матичности. За карактеризацију агресивног фенотипа коришћени су маркери епитела (ZO-1), мезенхима (виментина) и матичности (NANOG), који по литератури карактеришу ове фенотипове (Du и сар., 2018; Ке и сар., 2018; Khosravi и сар., 2021). Наведена комбинација маркера указује да је у овим ћелијама присутан ЕМТ процес, као и да имају матичне одлике. Према литератури и са аспекта истраживања ове дисертације, ћелије које испољавају ове маркере важе за агресивне и показују значајан метастаски потенцијал. Међутим, познато је да овакве ћелије могу бити дормантне, одговорне за резистенцију, пролиферативни капацитет и преживљавање карцинома. Литературни подаци показују да су ове ћелије заступљене у малом проценту у популацији епителних ћелија (Kim и сар., 2017; Frank и сар., 2021), што корелира са нашим резултатима, где је у популацији епителних ћелија детектовано свега 10-14% ћелија агресивног фенотипа. У напредним стадијумима је проценат заступљености агресивног фенотипа већи, што је и очекивано и у корелацији са агресивношћу III и IV стадијума CRC-а.

Испитивани третман киселином 10H2DA у обе концентрације није индуковао смањење заступљености агресивног фенотипа у популацији епителних ћелија у почетном стадијуму односу на контролне узорке. Ово указује да су почетни стадијуми отпорнији на третман овом киселином и да услед повећања епителног фенотипа долази до „заштите“ ових ћелија од утицаја третмана. Запажа се одређени пораст агресивног фенотипа у вишој концентрацији што се може објаснити регулацијом на нивоу епителних ћелија у третману већом концентрацијом у почетном стадијуму.

За разлику од почетних стадијума у напредном стадијуму третман је индуковао драстично смањење агресивног фенотипа у односу на контролне узорке. Ови резултати корелирају и са смањењем заступљености маркера који карактеришу овај фенотип под утицајем испитиваног третмана.

У смањењу агресивног фенотипа такође је концентрација 10 μM , индуковала бољи ћелијски одговор, што указује да ниже концентрације третмана снижавају агресивни фенотип и дају боље ефекте на испитиваним примарним културама.

Детекција агресивног фенотипа код пацијената значајна за прогнозу и исход болести, па је идентификација маркера на генском и протеинском нивоу један од значајних таргета у будућем истраживањима која се спроводе на узорцима пацијената.

Наши резултати указују да је агресивни фенотип очигледно присутан и у почетним и у напредним стадијумима. Судбина ових детектованих агресивних ћелија је неизвесна и у контексту стадијума, као и у контексту других испитиваних маркера. Добијени резултати иду у прилог доказима о пластичности и хетерогености карциномског ткива, али и сваке појединачне карциномске ћелије.

Према литературним подацима и β -катенин, који је укључен у Wnt сигнални пут, представља заједно са LEF/TCF транскрипционим факторима значајан регулатор матичног фенотипа, поред улоге у EMT процесу. Обзиром да је Wnt сигнални пут одговоран за одржавање матичног компартмана у дебелом цреву, а и један од кључних сигналних путева одговорних за EMT процес, стање матичности и агресивно понашање CRC, и стога је очигледно да је β -катенин у центру регулације свих ових процеса у CRC-у (Brabletz и сар., 2005).

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу приказаних резултата, можемо извести следеће:

Опште закључке

- ❖ Имортализоване ћелијске линије изоловане из различитих стадијума колоректалног карцинома су окарактерисане према типу ћелијске миграције, миграторног/инвазивног потенцијала, степена ЕМТ-а и присуства матичних одлика.
- ❖ Констатоване су разлике у ћелијском одговору имортализованих ћелијских линија из различитих стадијума на испитиване третмане матичним млечом и активном супстанцом млеча 10H2DA у погледу миграторног механизма.
- ❖ Матични млеч, а пре свега 10H2DA, показали су позитивне ефекте на супресију ЕМТ-а и матичности, као кључних механизма одговорних за миграторни/инвазивни потенцијал и агресивно понашање у имортализованим ћелијским линијама.
- ❖ Одлике ћелијских популација и њихова заступљеност у почетним/напредним стадијумима CRC-а корелирају са карактеристикама и степеном прогресије колоректалног карцинома.
- ❖ Третман 10H2DA смањивао је проценат агресивног фенотипа епителних ћелија у почетним/напредним стадијумима колоректалног карцинома.

Специфичне закључке

- ❖ Тестирани узорак матичног млеча се може окарактерисати као добар, са аспекта садржаја незасићене масне киселине 10H2DA, и фенолних компоненти из групе флавоноида.
- ❖ Испитивани третмани ММ-ом и киселином 10H2DA не показују цитотоксични ефекат на ћелијским линијама колоректалног карцинома (SW-480 и HCT-116).
- ❖ Имортализоване ћелијске линије су окарактерисане на основу типа миграције; колективна миграција је главни тип кретања SW-480 ћелија, док је индивидуална миграција је карактеристична за HCT-116 ћелије.
- ❖ Испитивани третмани показују антимиграторне/антиинвазивне ефекте који су резултат смањеног интензитета ЕМТ процеса као последице супресије промиграторних/проинвазивних маркера (нуклеарни β -катенин, SNAIL, N-кадхерин, виментин и α -SMA) у имортализованим ћелијским линијама колоректалног карцинома.

- ❖ Најбоље антимиграторне/антиинвазивне ефекте је испољила активна супстанца млеча, незасићена масна киселина 10H2DA, на обе тестиране имортализоване ћелијске линије.
- ❖ HCT-116 ћелије су осетљивије на третмане, нарочито киселином 10H2DA, у смислу антимиграторних/антиинвазивних ефеката третмана, смањења ЕМТ процеса и редукције матичних одлика.
- ❖ Интензитет ЕМТ процеса заједно са одликама матичности стоји у основи миграторног/инвазивног потенцијала и степена агресивности имортализованих ћелијских линија.
- ❖ У имортализованим ћелијским линијама су детектоване ћелије са матичним одликама праћењем маркера NANOG, и ALDH1B1, а третмани су супримирали експресију ових маркера у третираним ћелијама.
- ❖ На основу комбинације специфичних протеинских маркера, у примарној ћелијској култури детектовани су епителни, мезенхимски и матични фенотипови ћелија, чија је заступљеност корелирала са стадијумом CRC-а из ког је култура изолована.
- ❖ Ћелије са матичним и епителним одликама су детектоване у највећем проценту у испитиваним узорцима почетног и напредног стадијума.
- ❖ Епителни фенотип са одликама матичности је одговоран за агресивнију форму CRC-а и ћелије са овим карактеристикама су детектоване и у почетном и у напредном стадијуму.
- ❖ Фенотипски профил примарних ћелијских култура је под регулацијом кључних ЕМТ маркера SLUG-а и SNAIL-а, као и маркера матичности NANOG-а, ЕpCAM-а, OCT3/4 и KLF4.
- ❖ У испитиваним имортализованим и изолованим ћелијским културама почетног и напредног стадијума је детектовано присуство ЕМТ-а, на основу присуства специфичних регулаторних и ефекторних маркера.
- ❖ Нижа концентрација киселине 10H2DA је редуковала ЕМТ процес и матичне одлике у примарној ћелијској култури изолованој из почетног стадијума CRC-а, чиме је и агресивност ћелија овог стадијума CRC-а супримирана.
- ❖ Третман киселином 10H2DA је показао позитивне ефекте на супресију ЕМТ-а и матичности у примарној ћелијској култури изолованој из напредног стадијума CRC-а. Инхибиција ових механизма одговорних за миграторни/инвазивни потенцијал и агресивно понашање CRC-а, зависи од модификације нивоа експресије главних регулатора наведених процеса, првенствено снижења: SLUG-A, SNAIL-A, NANOG-a, EpCAM-a и KLF4.

Коначан закључак

На основу изнетих резултата, може се закључити да испитивани третман 10H2DA има инхибиторне ефекте на миграцију и инвазију имортализованих и примарних ћелијских култура, као почетне процесе метастатске каскаде. Ефекти киселине 10H2DA се заснивају на супресији ЕМТ процеса и одлика матичности. Специфична изолована компонента млека, незасићена масна киселина 10H2DA, је биоактивна супстанца која показује значајно боље биолошке ефекте у односу на матични млеко. Пчелињи производи дају обећавајуће резултате на изолованим примарним ћелијским културама колоректалног карцинома. Обзиром на ћелијски специфичне одговоре на испитиване дозе третмана, добијене у овом истраживању, потребне су додатне анализе ефеката 10H2DA, како би се унапредили антитуморски ефекти овог третмана на миграторне и инвазивне форме колоректалног карцинома.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abandansari RM, Parsian H, Kazerouni F, Porbagher R, Zabihi E, Rahimipour A. Effect of simultaneous treatment with royal jelly and doxorubicin on the survival of the prostate cancer cell line (PC3): an *in vitro* study. *International Journal of Cancer Management*. 2018; 11(4): e13780. <https://doi.org/10.5812/ijcm.13780>
2. Ahmad S, Campos MG, Fratini F, Altaye SZ, Li J. New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(2): 382. <https://doi.org/10.3390/ijms21020382>
3. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C. TNM and modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2014; 7(9): 2828-35.
4. Al Khatib AM, Stepan AE, Margaritescu C, Simionescu C, Ciurea RN. E-cadherin and Snail immunoexpression in colorectal adenocarcinomas. *Current Health Sciences Journal*. 2019; 45(2): 204-209. doi: 10.12865/CHSJ.45.02.12
5. Albers B, Auer R, Caci L, Nyantakyi E, Plys E, Podmore C, Riegel F, Selby K, Walder J, Clack L. Implementing organized colorectal cancer screening programs in Europe - protocol for a systematic review of determinants and strategies. *Systematic Reviews*. 2023; 12: 26. <https://doi.org/10.1186/s13643-023-02193-6>
6. Alberti T, Coelho D, Voytena A, Iacovski R, Mazzarino L, Maraschin M, Veleirinho B. Effect of propolis nanoparticles on early-stage wound healing in a diabetic noncontractile wound model. *Nanotechnology and Advanced Material Science*. 2019; 2(1): 1–10.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th Ed., Garland Science, New York, 2008.
8. Ali Abdalla YO, Subramaniam B, Nyamathulla S, Shamsuddin N, Arshad NM, Mun KS, Awang K, Nagoor NH. Natural products for cancer therapy: a review of their mechanism of actions and toxicity in the past decade. *Journal of Tropical Medicine*. 2022; 2022: 5794350. doi: 10.1155/2022/5794350
9. Ali MY, Anand SV, Tangella K, Ramkumar D, Saif TA. Isolation of primary human colon tumor cells from surgical tissues and culturing them directly on soft elastic substrates for traction cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; 100: e52532. doi: 10.3791/52532
10. Ali AM, Kunugi H. Apitherapy for age-related skeletal muscle dysfunction (sarcopenia): a review on the effects of royal jelly, propolis, and bee pollen. *Foods*. 2020; 9(10): 1362. doi: 10.3390/foods9101362
11. Alvina FB, Gouw AM, Le A. Cancer stem cell metabolism. In: Le A, editor. The heterogeneity of cancer metabolism. 2nd edition. Cham (CH): Springer; 2021.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573688/> doi: 10.1007/978-3-030-65768-0_12
12. Alzahrani KM, Fallatah SM, Almehmadi RA, Alghamdi JS, Alsulaimani AI, Alkhaldi LM, Alsuwayhi AG. Colorectal cancer and its screening among public in the western region of Saudi Arabia. *Cureus*. 2022; 14(7): e27404. doi: 10.7759/cureus.27404
 13. Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, Kole D, Holmes WF, Hedblom E, Page RL, Dominko T. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *International Journal of Developmental Biology*. 2010; 54: 1743-1754. doi: 10.1387/ijdb.103192sa
 14. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anatomy and Cell Biology*. 2014; 47: 1-11. doi: 10.5115/acb.2014.47.1.1
 15. Amjad E, Sokouti B, Asnaashari S. A systematic review of anti-cancer roles and mechanisms of kaempferol as a natural compound. *Cancer Cell International*. 2022; 22(1): 260. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02673-0>
 16. Angius A, Scanu AM, Arru C, Muroli MR, Rallo V, Deiana G, Ninniri MC, Carru C, Porcu A, Pira G, Uva P, Cossu-Rocca P, De Miglio MR. Portrait of cancer stem cells on colorectal cancer: molecular biomarkers, signaling pathways and miRNAome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 1603. <https://doi.org/10.3390/ijms22041603>
 17. Asma ST, Acaroz U, Imre K, Morar A, Shah SRA, Hussain SZ, Arslan-Acaroz D, Demirbas H, Hajrulai-Musliu Z, Istanbulgil FR, Soleimanzadeh A, Morozov D, Zhu K, Herman V, Ayad A, Athanassiou C, Ince S. Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs. *Cancers*. 2022; 14(24): 6203. <https://doi.org/10.3390/cancers14246203>
 18. Ayna A, Darendelioglu E. Evaluation of the biological activities of royal jelly on prostate and breast cancer cells. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*. 2022; 11(3): 166-170. doi: 10.46810/tdfd.1149604
 19. Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis. *Trends in Cell Biology*. 2020; 30(10): 764-776. doi: 10.1016/j.tcb.2020.07.003
 20. Bankovic J, Stojic J, Jovanovic D, Andjelkovic T, Milinkovic V, Ruzdijic S, Tanic N. Identification of genes associated with non-small cell lung cancer promotion and progression. *Lung Cancer*. 2010; 67(2): 151-159. doi: 10.1016/j.lungcan.2009.04.010
 21. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes and Development*. 2008; 22(14): 1856-64. doi: 10.1101/gad.1674008

22. Baster Z, Li L, Kukkurainen S, Chen J, Pentikainen O, Gyorffy B, Hytonen VP, Zhu H, Rajfur Z, Huang C. Cyanidin-3-glucoside binds to talin and modulates colon cancer cell adhesions and 3D growth. *The FASEB Journal*. 2020; 34(2): 2227–37. <https://doi.org/10.1096/fj.201900945R>
23. Battistelli C, Diederich M, Strippoli R, Keane TJ, Sandoval P, Valente S. Molecular mechanisms and new therapeutic targets in epithelial to mesenchymal transition (EMT) and fibrosis. *Frontiers Media SA*. 2020; 10: 1556. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01556>
24. Baygi ME, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biology and Toxicology*. 2010; 26: 553–567. <https://doi.org/10.1007/s10565-010-9163-5>
25. Begicevic RR, Falasca M. ABC Transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(11): 2362. doi: 10.3390/ijms18112362
26. Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Molecular and Cellular Biology*. 1998; 18(4): 1866–78. doi: 10.1128/MCB.18.4.1866
27. Benesch MGK, Mathieson A. Epidemiology of mucinous adenocarcinomas. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(11): 3193. doi: 10.3390/cancers12113193
28. Bhome R, Emaduddin M, James V, House LM, Thirdborough SM, Mellone M, Tulkens J, Primrose JN, Thomas GJ, De Wever O, Mirnezami AH, Sayan AE. Epithelial to mesenchymal transition influences fibroblast phenotype in colorectal cancer by altering miR-200 levels in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2022; 11(5): e12226. <https://doi.org/10.1002/jev2.12226>
29. Bian X, Cao F, Wang X, Hou Y, Zhao H, Liu Y. Establishment and characterization of a new human colon cancer cell line, PUMC-CRC1. *Scientific Reports*. 2021; 11(1): 13122. doi: 10.1038/s41598-021-92491-7
30. Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CA, Luengo MB, Queiroz ML. Effects produced by royal jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International Immunopharmacology*. 2005; 5(4): 679–88. doi: 10.1016/j.intimp.2004.11.015
31. Boesch M, Spizzo G, Seeber A. Concise review: aggressive colorectal cancer: role of epithelial cell adhesion molecule in cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Stem Cells Translational Medicine*. 2018; 7(6): 495–501. doi: 10.1002/sctm.17-0289

32. Bogdanov S. Royal jelly, bee brood: composition, nutrition, health. In: The royal jelly book. Chapter 2. *Bee Product Science*. 2016.
33. Borawska MH, Markiewicz-Żukowska R, Naliwajko SK, Moskwa J, Bartosiuk E, Socha K, Surazyński A, Kochanowicz J, Mariak Z. The interaction of bee products with temozolomide in human diffuse astrocytoma, glioblastoma multiforme and astroglia cell lines. *Nutrition and Cancer*. 2014; 66(7): 1247-1256, doi: 10.1080/01635581.2014.951735
34. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and β -catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005; 179(1-2): 56-65. <https://doi.org/10.1159/000084509>
35. Braoudaki M, Ahmad MS, Mustafov D, Seriah S, Siddiqui MN, Siddiqui SS. Chemokines and chemokine receptors in colorectal cancer; multifarious roles and clinical impact. *Seminars in Cancer Biology*. 2022; 86: 436-49. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.06.002>
36. Brekhman V, Neufeld G. A novel asymmetric 3D in-vitro assay for the study of tumor cell invasion. *BMC cancer*. 2009; 9: 415. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-415>
37. Brzozowa M, Michalski M, Wyrobiec G, Piecuch A, Dittfeld A, Harabin-Słowińska M, Boroń D, Wojnicz R. The role of Snail1 transcription factor in colorectal cancer progression and metastasis. *Contemporary Oncology*. 2015; 19(4): 265-70. doi: 10.5114/wo.2014.42173
38. Bu F, Tu Y, Wan Z, Tu S. Herbal medicine and its impact on the gut microbiota in colorectal cancer. *Frontiers in Cell and Infection Microbiology*. 2023; 13: 1096008. doi: 10.3389/fcimb.2023.1096008
39. Byun MR, Sung MK, Kim AR, Lee CH, Jang EJ, Jeong MG, Noh M, Hwang ES, Hong JH. (-)-Epicatechin gallate (ECG) stimulates osteoblast differentiation via runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)-mediated transcriptional activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(14): 9926 -9935.
40. Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World Journal of Stem Cells*. 2015; 7(1): 27-36. doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.27
41. Caiazza F, Ryan EJ, Doherty G, Winter DC, Sheahan K. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*. 2015; 5: 19. doi: 10.3389/fonc.2015.00019
42. Çalışkan E, Ayna A, Tunç A, Özbolat S, Bengü AŞ, Aykutoğlu G, Çiftci M, Darendelioğlu E. Antioxidant activities of Bingöl royal jelly on SH-SY5Y cells.

- International Journal of Nature and Life Sciences*. 2021; 5(2): 61-69. doi: 10.47947/ijnls.1008223
43. Campbell K, Casanova J. A common framework for EMT and collective cell migration. *Development*. 2016; 143(23): 4291–300. <https://doi.org/10.1242/dev.139071>
44. Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, Hsieh YS. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*. 2006; 235(2): 248–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.033>
45. Chen Q, Lin W, Yin Z, Zou Y, Liang S, Ruan S, Chen P, Li S, Shu Q, Cheng B, Ling C. Melittin inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation and epithelial-mesenchymal transition through suppression of HIF-1 α /Akt pathway in liver cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019; 2019: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/9602935>
46. Chen D, Yuan M, Ye Q, Wang X, Xu J, Shi G, Hu Z. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits epithelial-to-mesenchymal transition, and migration and invasion of breast cancer cells by upregulating KLF4. *Food & Nutrition Research*. 2020; 64. doi: 10.29219/fnr.v64.4240
47. Chen X, Zhang W, Xu X. Cyanidin-3-glucoside suppresses the progression of lung adenocarcinoma by downregulating TP53I3 and inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. *World Journal of Surgical Oncology*. 2021; 19: 232. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02339-7>
48. Cheng Z, Zhang Z, Han Y, Wang J, Wang Y, Chen X, Shao Y, Cheng Y, Zhou W, Lu X, Wu Z. A review on anti-cancer effect of green tea catechins. *Journal of Functional Foods*. 2020; 74: 104172. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104172>
49. Chiou, SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Research*. 2010; 70(24): 10433–44. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2638>
50. Choi SY, Sung R, Lee SJ, Lee TG, Kim N, Yoon SM, Lee EJ, Chae HB, Youn SJ, Park SM. Podoplanin, α -smooth muscle actin or S100A4 expressing cancer-associated fibroblasts are associated with different prognosis in colorectal cancers. *Journal of Korean Medical Science*. 2013; 28(9): 1293. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.9.1293>
51. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162(1): 156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999

52. Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Battu S, Mathonnet M. The extracellular domain of E cadherin linked to invasiveness in colorectal cancer: a new resistance and relapses monitoring serum-bio marker? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2017; 143(7): 1177-1190. doi: 10.1007/s00432-017-2382-x
53. Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015; 36: 13-22. doi: 10.1016/j.ceb.2015.06.004
54. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *Journal of Cell Biology*. 2003; 163(4): 847-57. doi: 10.1083/jcb.200308162
55. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018; 15(2): 81-94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166
56. Dai X, Ge J, Wang X, Qian X, Zhang C, Li X. OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncology Reports*. 2013; 29: 155-160. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2086>
57. Dai YC, Fang CY, Yang HY, Jian YJ, Wang SC, Liu YW. The correlation of epithelial-mesenchymal transition-related gene expression and the clinicopathologic features of colorectal cancer patients in Taiwan. *PLoS One*. 2021; 16(7): e0254000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254000>
58. Di Zazzo, Galasso G, Giovannelli P, Di Donato M, Bilancio A, Perillo B, Sinisi AA, Migliaccio A, Castoria G. Estrogen receptors in epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer. *Cancers*. 2019; 11(10): 1418. <https://doi.org/10.3390/cancers11101418>
59. Du L, Li J, Lei L, He H, Chen E, Dong J, Yang J. High vimentin expression predicts a poor prognosis and progression in colorectal cancer: a study with meta-analysis and TCGA database. *BioMed Research International*. 2018; 2018: 6387810. doi: 10.1155/2018/6387810
60. El-Bahrawy M, Poulsom R, Rowan AJ, Tomlinson IT, Alison MR. Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Experimental Pathology*. 2004; 85(2): 65-74. doi: 10.1111/j.0959-9673.2004.0371.x
61. Elkhateeb WA, El-Ghwas DE, Daba GM. Mushrooms and lichens the factory of important secondary metabolites: review. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*. 2023; 4(6): 1072-1082. doi: 10.37871/jbres1770

62. Elzagheid A, Algars A, Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Collan Y, Syrjanen K, Pyrhonen S. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. *World Journal of Gastroenterology*. 2006; 12(27): 4304-9. doi: 10.3748/wjg.v12.i27.4304
63. Eroğlu C, Avcı E, Vural H, Kurar E. Anticancer mechanism of sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene*. 2018; 671: 127-134. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.049
64. Failli A, Consolini R, Legitimo A, Spisni R, Castagna M, Romanini A, Crimaldi G, Miccoli P. The challenge of culturing human colorectal tumor cells: establishment of a cell culture model by the comparison of different methodological approaches. *Tumori*. 2009; 95: 343-347. doi: 10.1177/030089160909500312
65. Fan F, Samuel S, Evans KW, Lu J, Xia L, Zhou Y, Sceusi E, Tozzi F, Ye XC, Mani SA, Ellis LM. Overexpression of Snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Medicine*. 2012; 1: 5-16. doi: 10.1002/cam4.4
66. Ferioli F, Marcazzan GL, Caboni MF. Determination of (E)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly: a comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*. 2007; 30: 1061-1069. doi: 10.1002/jssc.200600416
67. Filipič B, Gradišnik L, Rihar K, Šooš E, Pereyra A, Potokar J. The influence of royal jelly and HuIFN- α N3 on proliferation, glutathione, and lipid peroxidation in human colorectal adenocarcinoma cells *in vitro*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2015; 66: 269-274. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2632>
68. Frank MH, Wilson BJ, Gold JS, Frank NY. Clinical implications of colorectal cancer stem cells in the age of single-cell omics and targeted therapies. *Gastroenterology*. 2021; 160(6): 1947-1960. doi: 10.1053/j.gastro.2020.12.080
69. Fratellone PM, Tsimis F, Fratellone G. Apitherapy products for medicinal use. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2016; 22(12): 1020-1022. doi: 10.1089/acm.2015.0346
70. Freshney IR. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Alan R. Liss, New York, 1983, 293 pp.
71. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3(5): 362-74. doi: 10.1038/nrc1075
72. Ganai, SA. Natural HDAC inhibitors for epigenetic combating of cancer progression. 1st ed., CRC Press, 2022. <https://doi.org/10.1201/9781003294863>
73. Garcia-Amoedo LH, de Almeida-Muradian LB. Determination of trans-10-hydroxy—2-decenoic acid (10-HAD) in royal jelly from Sao Paulo state, Brazil. *A Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2003; 23: 62-65.

74. Genc M, Aslan A. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*. 1999; 839: 265-68.
75. Gires O, Pan M, Schinke H, Canis M, Baeuerle PA. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years?. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2020; 39: 969–987 <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09898-3>
76. Godlewski J, Kmiec Z. Colorectal cancer invasion and atrophy of the enteric nervous system: potential feedback and impact on cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(9): 3391. doi: 10.3390/ijms21093391
77. Golla JP, Kandyliari A, Ying TW, Chen Y, Orlicky DJ, Thompson DC, Shah YM, Vasiliou V. Interplay between APC and ALDH1B1 in a newly developed mouse model of colorectal cancer, *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 331: 109274. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109274>
78. Gong Z, Gu G, Wang Y, Dong S, Tan K, Nieh JC. Floral tea polyphenols can improve honey bee memory retention and olfactory sensitivity. *Journal of Insect Physiology*. 2021; 128: 104177. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104177>
79. Greco L, Rubbino F, Morelli A, Gaiani F, Grizzi F, de'Angelis GL, Malesci A, Laghi L. Epithelial to mesenchymal transition: a challenging playground for translational research. Current models and focus on TWIST1 relevance and gastrointestinal cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 11469. <https://doi.org/10.3390/ijms222111469>
80. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells *in vitro*. *Biomed Research International*. 2007; 28(5): 261-6. doi: 10.2220/biomedres.28.261
81. He Z, He J, Xie K. KLF4 transcription factor in tumorigenesis. *Cell Death Discovery*. 2023; 9: 118. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01416-y>
82. Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Göke B, Kolligs FT. Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling. *BMC Genomics*. 2014; 15: 74. doi: 10.1186/1471-2164-15-74
83. Hida K, Maishi N, Takeda R, Hida Y. The roles of tumor endothelial cells in cancer metastasis. In *Metastasis*. Segi, 137–48. Exon Publications, Canada. 2022; 137–48. <https://doi.org/10.36255/exon-publications.metastasis.endothelial-cells>
84. Honda Y, Araki Y, Hata T, Ichihara K, Ito M, Tanaka M, Honda S. 10-hydroxy-2-decenoic acid, the major lipid component of royal jelly, extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through dietary restriction and target of rapamycin

- signaling. *Journal of Aging Research*. 2015; 2015: 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/425261>
85. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, Lim YC, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, Goh KW, Hadi MA. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk Factors, preventive and treatment strategies. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(7): 1732. doi: 10.3390/cancers14071732
86. Hostanska K, Jürgenliemk G, Abel G, Nahrstedt A, Saller R. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detection and Prevention*. 2007; 31(2): 129-39. doi: 10.1016/j.cdp.2007.03.001
87. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014; 6(3): 1769-1792.
88. Huang JL, Oshi M, Endo I, Takabe K. Clinical relevance of stem cell surface markers CD133, CD24, and CD44 in colorectal cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2021; 11(10): 5141-5154.
89. Huang XM, Yang ZJ, Xie Q, Zhang ZK, Zhang H, Ma JY. Natural products for treating colorectal cancer: a mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019; 117: 109142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109142>
90. Huang SF, Horng CT, Hsieh YS, Hsieh YH, Chu SC, Chen PN. Epicatechin-3-gallate reverses TGF-B1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits cell invasion and protease activities in human lung cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2016; 94: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.05.009>
91. Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, Lan HY, Su SH, Chang SC, Teng HW, Yang SH, Lan YT, Chiou SH, Wang HW. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*. 2011; 141(1): 279-291. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.008>
92. Hwang GR, Yuen JG, Ju J. Roles of microRNAs in gastrointestinal cancer stem cell resistance and therapeutic development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 1624. <https://doi.org/10.3390/ijms22041624>
93. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, Spencer-Dene B, Hossaini S, Abuzinadah M, Li N, Fadhil W, Ilyas M, Bonnet D, Nateri AS. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells*. 2012; 30: 2076–2087. doi: 10.1002/stem.1182
94. Itatani Y, Kawada K, Inamoto S, Yamamoto T, Ogawa R, Taketo MM, Sakai Y. The role of chemokines in promoting colorectal cancer invasion/metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(5): 643. <https://doi.org/10.3390/ijms17050643>

95. Ito S, Nitta Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Ikeno K, Nakamura T, Furukawa S. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 2012: 139140. doi: 10.1155/2012/139140
96. Ivaska J. Vimentin: central hub in EMT induction? *Small GTPases*. 2011; 2(1): 51-53. doi: 10.4161/sgtp.2.1.15114
97. Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. 10-hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *eCAM*. 2009; 6(4): 489-494. doi:10.1093/ecam/nem152
98. Janković SM. Maligni tumori debelog creva. Medicinski fakultet, Kragujevac, 2007: 1-43.
99. Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG. Concise review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions. *Stem Cells*. 2015; 33(8): 2381-90. <https://doi.org/10.1002/stem.2007>
100. Jiang H, Tang Y, Garg HK, Parthasarathy DK, Torregrossa AC, Hord NG, Bryan NS. Concentration- and stage-specific effects of nitrite on colon cancer cell lines. *Nitric Oxide*. 2012; 26(4): 267-73. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.010>
101. Jing N, Gao WQ, Fang YX. Regulation of formation, stemness and therapeutic resistance of cancer stem cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9: 641498. doi: 10.3389/fcell.2021.641498
102. Johal J, Han CY, Joseph R, Munn Z, Agbejule OA, Crawford-Williams F, Wallen MP, Chan RJ, Hart NH. Dietary supplements in people with metastatic cancer who are experiencing malnutrition, cachexia, sarcopenia, and frailty: a scoping review. *Nutrients*. 2022; 14(13): 2642. doi: 10.3390/nu14132642
103. Jovanović MM, Šeklić DS, Rakobradović JD, Planojević NS, Vuković NL, Vukić MD, Marković SD. Royal jelly and trans-10-hydroxy-2-decenoic acid inhibit migration and invasion of colorectal carcinoma cells. *Food Technology and Biotechnology*. 2022; 60(2): 213-24. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7495>
104. Kalantari E, Taheri T, Fata S, Abolhasani M, Mehrazma M, Madjd Z, Asgari M. Significant co-expression of putative cancer stem cell markers, EpCAM and CD166, correlates with tumor stage and invasive behavior in colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*. 2022; 20: 15. <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02469-y>
105. Kanelis D, Tananaki C, Liolios V, Dimou M, Goras G, Rodopoulou MA, Karazafiris E, Thrasyvoulou A. A suggestion for royal jelly specifications/Prijedlog globalnih standarda za matičnu mliječ. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2015; 66(4): 275-84. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2651>

106. Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2011; 2011: 981793. doi: 10.1155/2011/981793
107. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*. 2012; 2(1): 1-5. doi: 10.4161/spmg.19885
108. Ke J, Shao W, Jiang Y, Xu J, Li F, Qin J. MicroRNA-103 regulates tumorigenesis in colorectal cancer by targeting ZO-1. *Molecular Medicine Reports*. 2018; 17: 783-788. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8007>
109. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. Review. *Genes & Development*. 2005; 19: 1129–115. doi: 10.1101/gad.1303605
110. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019; 3(6): 165-180. doi: 10.15698/cst2019.06.188.
111. Khalek FJA, Gallicano GI, Mishra L. Colon cancer stem cells. *Gastrointestinal Cancer Research*. 2010; 1: S16–S2.
112. Khaliq AM, Erdogan C, Kurt Z, Turgut SS, Grunvald MW, Rand T, Khare S, Borgia JA, Hayden DM, Pappas SG, Govekar HR, Kam AE, Reiser J, Traga K, Radovich M, Zang Y, Qiu Y, Liu Y, Fishel ML, Turk A, Gupta V, Al-Sabti R, Subramanian J, Kuzel TM, Sadanandam A, Waldron L, Hussain A, Saleem M, El-Rayes B, Salahudeen AA, Masood A. Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas. *Genome Biology*. 2022; 23: 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02677-z>
113. Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New findings on biological actions and clinical applications of royal jelly: a review. *Journal of Dietary Supplements*. 2018; 15(5): 757–75. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1363843>
114. Khosravi N, Shahgoli VK, Amini M, Safaei S, Mokhtarzadeh A, Mansoori B, Derakhshani A, Bagbanzadeh A, Baradaran B. Suppression of Nanog inhibited cell migration and increased the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *European Journal of Pharmacology*. 2021; 894: 173871. doi:10.1016/j.ejphar.2021.173871
115. Kim YS, Kaidina AM, Chiang JH, Yarygin KN, Yu A. Lupatov. Cancer stem cell molecular markers verified *in vivo*. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2017; 11(1): 43–54. doi: 10.18097/PBMC20166203228
116. Kim WK, Kwon Y, Jang M, Park M, Kim J, Cho S, Jang DG, Lee WB, Jung SH, Choi HJ, Min BS, Il Kim T, Hong SP, Paik YK, Kim H. β -catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 18440. doi: 10.1038/s41598-019-54890-9

117. Kimura Y. Antitumor and antimetastatic actions of various natural products. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2008; 34: 35-76.
118. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 2018: 1-29. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>
119. Kopenhaver J, Crutcher M, Waldman SA, Snook AE. The shifting paradigm of colorectal cancer treatment: a look into emerging cancer stem cell-directed therapeutics to lead the charge toward complete remission. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2021; 21(10): 1335-1345. doi: 10.1080/14712598.2021.1929167
120. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020; 12(2): 457. doi: 10.3390/nu12020457
121. Kosanić M, Šeklić DS, Jovanović MM, Petrović N, Marković SD. *Hygrophorus eburneus*, edible mushroom, a promising natural bioactive agent. *EXCLI Journal*. 2020; 19: 442-57. <https://doi.org/10.17179/excli2019-2056>
122. Koya-Miyata S, Okamoto I, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2004; 68(4): 767-73. doi: 10.1271/bbb.68.767
123. Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV, Perelmuter VM. Cancer invasion: patterns and mechanisms. *Acta Naturae*. 2015; 7(2): 17-28.
124. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014; 14: 275-291. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006
125. Kuppusamy P, Govindan N, Yusoff MM, Ichwan SJA. Proteins are potent biomarkers to detect colon cancer progression. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017; 24: 1212-1221. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.09.017
126. Ladke VS, Kumbhar GM, Joshi K, Kheur S, Bhonde R, Raut C. Isolation, culture and morphological assessment of primary cell lines from human primary oral squamous cell carcinoma using explant technique. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2023; 24(1): 257-266. doi: 10.31557/APJCP.2023.24.1.257
127. Langan RC, Mullinax JE, Raiji MT, Upham T, Summers T, Stojadinovic A, Avital I. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. Review. *Journal of Cancer*. 2013; 4(3): 241-250. doi: 10.7150/jca.5832
128. Leng Z, Li Y, Zhou G, Lv X, Ai W, Li J, Hou L. Krüppel-like factor 4 regulates stemness and mesenchymal properties of colorectal cancer stem cells through the TGF- β 1/Smad/Snail pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020; 24(2): 1866-77. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14882>

129. Li Z, Feng C, Dong H, Jin W, Zhang W, Zhan J, Wang S. Health promoting activities and corresponding mechanism of (-)-epicatechin-3-gallate. *Food Science and Human Wellness*. 2022; 11(3): 568–78. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.12.013>
130. Liang L, Liu X, He J, Shao Y, Liu J, Wang Z, Xia L, Han T, Wu P. Cyanidin-3-glucoside induces mesenchymal to epithelial transition via activating Sirt1 expression in triple negative breast cancer cells. *Biochimie*. 2019; 162: 107–15. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.004>
131. Lichota A, Gwozdziński K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(11): 3533. doi: 10.3390/ijms19113533
132. Lin ZS, Chu HC, Yen YC, Lewis BC, Chen YW. Krüppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing Slug expression. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e43593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043593>.
133. Lin XM, Liu SB, Luo YH, Xu WT, Zhang Y, Zhang T, Xue H, Zuo WB, Li YN, Lu BX, Jin CH. 10-HDA induces ROS-mediated apoptosis in A549 human lung cancer cells by regulating the MAPK, STAT3, NF-κB, and TGF-β1 signaling pathways. *BioMed Research International*. 2020; 2020: 1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/3042636>
134. Liskova A, Koklesova L, Samec M, Smejkal K, Samuel SM, Varghese E, Abotaleb M, Biringer K, Kudela E, Danko J, Shakibaei M, Kwon TK, Büsselberg D, Kubatka P. Flavonoids in cancer metastasis. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(6): 1498. doi: 10.3390/cancers12061498
135. Liu S, Sun J, Cai B, Xi X, Yang L, Zhang Z, Feng Y, Sun Y. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*. 2016; 37(7): 9671–80. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4848-x>
136. Liu M, Du Y, Li H, Wang L, Ponikwicka-Tyszko D, Lebiedzinska W, Pilaszewicz-Puza A, Liu H, Zhou L, Fan H, Wang M, You H, Wolczynnskii S, Rahman N, Guo YD, Li X. Cyanidin-3-o-glucoside pharmacologically inhibits tumorigenesis via estrogen receptor β in melanoma mice. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9: 1110. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01110>
137. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*. 2019; 8: 1118. <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
138. López-Gutiérrez N, Aguilera-Luiz MM, Romero-Gonzalez R, Vidal JLM, Frenich AG. Fast analysis of polyphenols in royal jelly products using automated

- TurboFlow™-liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2014; 973: 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.09.038>
139. Lopez-Lazaro M. Stem cell division theory of cancer. *Cell Cycle*. 2015; 14(16): 2547–2548. doi: 10.1080/15384101.2015.1062330
140. Luminturahardjo W, Soeatmadji DW, Mintaroem K, Rahajoe P, Sandra F. N-cadherin as an important marker in colorectal cancer: an investigation of b-catenin and cadherin expressions of SW-480 and HCT-116 cell lines. *The Indonesian Biomedical Journal*. 2021; 13(3): 289–94. <https://doi.org/10.18585/inabj.v13i3.1562>
141. Lupinacci S, Perri A, Totoda G, Vizza D, Puoci F, Parisi OI, Giordano F, Lofaro D, La Russa A, Bonofiglio M, Bonofiglio R. Olive leaf extract counteracts epithelial to mesenchymal transition process induced by peritoneal dialysis, through the inhibition of TGFβ1 signaling. *Cell Biology and Toxicology*. 2019; 35(2): 95–109. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-9438-9>
142. Ma Y, Wu L, Liu X, Xu Y, Shi W, Liang Y, Yao L, Zheng J, Zhang J. KLF4 inhibits colorectal cancer cell proliferation dependent on NDRG2 signaling. *Oncology Reports*. 2017; 38(2): 975–84. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5736>
143. MacDonald AW, Tayyab M, Arsalani-Zadeh R, Hartley JE, Monson JRT. Intramucosal carcinoma on biopsy reliably predicts invasive colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2009; 16(12): 3267–70. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0727-7>
144. Maghsoudlou A, Mahoonak AS, Mohebodini H, Toldra F. Royal jelly: chemistry, storage and bioactivities. *Journal of Apicultural Science*. 2019; 63(1): 17–40. <https://doi.org/10.2478/jas-2019-0007>
145. Majolo F, de Oliveira Becker Delwing LK, Marmitt DJ, Bustamante-Filho IC, Goetttert MI. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*. 2019; 31:196–207. 10.1016/j.phytol.2019.04.003
146. Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2008; 4(6): 697–720. doi:10.1517/17425255.4.6.697
147. Mărghitas LA, Bărnuliu LI, Dezmirean DS, Bobis O, Bonta V, Mărgăoan R, Gherman B. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in Transylvanian royal jelly. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*. 2013; 70(1): 9–14.
148. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18: 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>

149. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG. Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. In: Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience; 2013.
150. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970 May; 168(3934): 939-49. doi: 10.1126/science.168.3934.939
151. Mello BCBS, Petrus JCC, Hubinger MD. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*. 2010; 96(4): 533-39. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.040>
152. Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*. 2018; 37(35): 4769-4780. doi: 10.1038/s41388-018-0304-2
153. Mihajlović DA. Imunomodulatorna i antioksidativna svojstva hidroksi-2-dekanoične kiseline. Doktorska disertacija. Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, 2015.
154. Milner BL, Penny CB, Gibbon VE, Kay P, Ruff P. CD133/EpCAM cancer stem cell markers of tumour stage in colorectal cancer cells. *Journal of Tissue Science and Engineering*. 2014; 6: 1. doi: 10.4172/2157-7552.1000143
155. Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, Miyata T. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 101(1-3): 215-20. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.012>
156. Miyata Y, Sakai H. Anti-cancer and protective effects of royal jelly for therapy-induced toxicities in malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19: 1-16.
157. Mofid B, Rezaeizadeh H, Termos A, Rakhsha A, Mafi AR, Taheripanah T, Ardakani MM, Taghavi SM, Moravveji SA, Kashi AS. Effect of processed honey and royal jelly on cancer-related fatigue: a double-blind randomized clinical trial. *Electronic Physician Journal*. 2016; 8(6): 2475-82. doi: 10.19082/2475
158. Mokhtari M, Zakerzade Z. EPCAM expression in colon adenocarcinoma and its relationship with TNM staging. *Advanced Biomedical Research*. 2017; 6: 56. doi: 10.4103/2277-9175.205529
159. Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci L, De Maio G, Ulivi P. Heterogeneity in colorectal cancer: a challenge for personalized medicine? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(12): 3733. doi: 10.3390/ijms19123733
160. Moreno MR, Stempor PA, Bulgakova NA. Interactions and feedbacks in E-cadherin transcriptional regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9: 701175. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.701175>

161. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: 55-63.
162. Moutsatsou P, Papoutsis Z, Kassi E, Heldring N, Zhao C, Tsiapara A, Melliou E, Chrousos GP, Chinou I, Karshikoff A, Nilsson L, Dahlman-Wright K. Fatty acids derived from royal jelly are modulators of estrogen receptor functions. *PLoS One*. 2010; 5(12): e15594. doi:10.1371/journal.pone.0015594
163. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology*. 2018; 71(2): 110–16. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204739>
164. Mutha RE, Tatiya AU, Surana SJ. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021; 7: 25. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>
165. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2020; 117(11): 5931-5937. doi: 10.1073/pnas.1918167117
166. Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yuki Yoshi A, Tachibana H, Yamada K. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007; 71(1): 253–255, <https://doi.org/10.1271/bbb.60453>
167. Namiki K, Wongsirisin P, Yokoyama S, Sato M, Rawangkan A, Sakai R, Iida K, Suganuma M. (–)-Epigallocatechin gallate inhibits stemness and tumorigenicity stimulated by AXL receptor tyrosine kinase in human lung cancer cells. *Scientific Reports*. 2020; 10: 2444. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59281-z>
168. Nascimento AP, Moraes LAR, Ferreira NU, Moreno GP, Uahib FGM, Barizon EA, Berretta AA. The lyophilization process maintains the chemical and biological characteristics of royal jelly. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 2015: 1–5. <https://doi.org/10.1155/2015/825068>
169. Nasr Bouzaiane N, Jaziri SK, Kovacic H, Chekir-Ghedira L, Ghedira K, Luis J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 766: 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.044>
170. Natunen S, Satomaa T, Pitkänen V, Salo H, Mikkola M, Natunen J, Otonkoski T, Valmu L. The binding specificity of the marker antibodies Tra-1-60 and Tra-1-81 reveals a novel pluripotency-associated type 1 lactosamine epitope. *Glycobiology*. 2011; 21(9): 1125-30. doi: 10.1093/glycob/cwq209

171. Ni Q, Li M, Yu S. Research progress of epithelial-mesenchymal transition treatment and drug resistance in colorectal cancer. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2022; 21: 15330338221081219. doi: 10.1177/15330338221081219
172. Nietzer S, Baur F, Sieber S, Hansmann J, Schwarz T, Stoffer C, Hafner H, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Walles H, Dandekar G. Mimicking metastases Including tumor stroma: a new technique to generate a three-dimensional colorectal cancer model based on a biological decellularized intestinal scaffold. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2016; 22(7): 621–35. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0557>
173. Niknami Z, Muhammadnejad A, Ebrahimi A, Harsani Z, Shirkoohi R. Significance of E-cadherin and Vimentin as epithelial-mesenchymal transition markers in colorectal carcinoma prognosis. *EXCLI Journal*. 2020; 19: 917-926. doi: 10.17179/excli2020-1946
174. Nikolouzakis TK, Vassilopoulou L, Fragkiadaki P, Mariolis Sapsakos T, Papadakis G, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Tsiaoussis J. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncology Reports*. 2018: 1-18. doi: 10.3892/or.2018.6330
175. Nooteboom M, Johnson R, Taylor RW, Wright NA, Lightowlers RN, Kirkwood TB, Mathers JC, Turnbull DM, Greaves LC. Age-associated mitochondrial DNA mutations lead to small but significant changes in cell proliferation and apoptosis in human colonic crypts. *Aging Cell*. 2010; 9(1): 96–9. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00531
176. Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*. 2020; 124: 102–114. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01149-0>
177. Orsolić N, Terzić S, Mihaljević Z, Sver L, Basić I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005; 28(10): 1928-33. doi: 10.1248/bpb.28.1928
178. Orsolić N. Royal jelly: component efficiency, analysis, and standardisation. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2013; 64(3): 445-61. doi: 10.2478/10004-1254-64-2013-2332
179. Pączek S, Łukaszewicz-Zajac M, Mroczko B. Chemokines—what is their role in colorectal cancer? *Cancer Control*. 2020; 27(1): 107327482090338. doi:10.1177/1073274820903384
180. Pastor DM, Poritz LS, Olson TL, Kline CL, Harris LR, Koltun WA, Chinchilli VM, Irby RB. Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2010; 3(1): 69-83.

181. Paul CD, Hung WC, Wirtz D, Konstantopoulos K. Engineered models of confined cell migration. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2016; 18: 159-80. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040654
182. Pavel C, Marghitas LA, Bobis O, Desmirean DS, Sapcaliu A, Radoi I, Madas MN. Biological activities of royal jelly – review. *Scientific papers: Animal Science and Biotechnologies*. 2011; 44(2): 108-118.
183. Pavlič A, Urh K, Štajer K, Boštjančič E, Zidar N. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma: comparison between primary tumor, lymph node and liver metastases. *Frontiers in Oncology*. 2021; 11: 662806.
184. Pavlovic S, Petrovic I, Jovicic N, Ljubic B, Miletic Kovacevic M, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33 prevents MLD-STZ induction of diabetes and attenuate insulinitis in prediabetic nod mice. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2646. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02646>
185. Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Malheiros SM, Brandt RA, Cavaleiro S, Gamarra LF. In vitro analysis of neurospheres derived from glioblastoma primary culture: a novel methodology paradigm. *Frontiers in Neurology*. 2014; 4: 214. doi: 10.3389/fneur.2013.00214
186. Pećina-Šlaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International*. 2003; 3(1): 17. doi: 10.1186/1475-2867-3-17
187. Peng CC, Sun HT, Lin IP, Kuo PC, Li JC. The functional property of royal jelly 10-hydroxy-2-decenoic acid as a melanogenesis inhibitor. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17(1): 92. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1888-8>
188. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis front. *Cell and Developmental Biology*. 2019; 7: 107. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107>
189. Polacheck WJ, Zervantonakis IK, Kamm RD. Tumor cell migration in complex microenvironments. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012; 70(8): 1335-56. doi: 10.1007/s00018-012-1115-1
190. Ram AK, Vairappan B. Role of zonula occludens in gastrointestinal and liver cancers. *World Journal of Clinical Cases*. 2022; 10(12): 3647-3661. doi: 10.12998/wjcc.v10.i12.3647
191. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. *Journal of Functional Foods*. 2012; 4(1): 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>
192. Ramakrishnan AB, Cadigan KM. Wnt target genes and where to find them. *F1000Res*. 2017; 6: 746. doi: 10.12688/f1000research.11034.1

193. Richter M, Piwocka O, Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM, Trzeciak T. From donor to the lab: a fascinating journey of primary cell lines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9: 711381. doi: 10.3389/fcell.2021.711381
194. Ritch SJ, Brandhagen BN, Goyeneche AA, Telleria CM. Advanced assessment of migration and invasion of cancer cells in response to mifepristone therapy using double fluorescence cytochemical labeling. *BMC Cancer*. 2019; 19(1): 376. doi: 10.1186/s12885-019-5587-3
195. Rossi F, Noren H, Jove R, Beljanski V, Grinnemo KH. Differences and similarities between cancer and somatic stem cells: therapeutic implications. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020; 11: 489. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02018-6>
196. Rowehl RA, Burke S, Bialkowska AB, Pettet DW 3rd, Rowehl L, Li E, Antoniou E, Zhang Y, Bergamaschi R, Shroyer KR, Ojima I, Botchkina GI. Establishment of highly tumorigenic human colorectal cancer cell line (CR4) with properties of putative cancer stem cells. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99091. doi: 10.1371/journal.pone.0099091
197. Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2009; 1(1): 1-6. doi: 10.3896/IBRA.4.01.1.04
198. Saleh S, Salama A, Ali AM, Saleh AK, Elhady BA, Tolba E. Egyptian propolis extract for functionalization of cellulose nanofiber/poly(vinyl alcohol) porous hydrogel along with characterization and biological applications. *Scientific Reports*. 2023; 13: 7739. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34901-6>
199. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011; 68(18): 3033-46. doi: 10.1007/s00018-011-0735-1
200. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012; 9: 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
201. Shan Z, Wu W, Yan X, Yang Y, Luo D, Liu Q, Li X, Goel A, Ma Y. A novel epithelial-mesenchymal transition molecular signature predicts the oncological outcomes in colorectal cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2021; 25: 3194-3204. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16387>
202. Shi YY, Huang ZY, Wu XB, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ. Changes in alternative splicing in *Apis mellifera* bees fed *Apis cerana* royal jelly. *Journal of Apicultural Science*. 2014; 58(2): 25-31. doi: 10.2478/jas-2014-0019
203. Shia J, Klimstra DS, Bagci P, Basturk O, Adsay NV. TNM staging of colorectal carcinoma: issues and caveats. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2012; 29(3): 142-53. doi: 10.1053/j.semdp.2012.02.001

204. Shirzad M, Kordyazdi R, Shahinfard N, Nikokar M. Does royal jelly affect tumor cells? *Journal of HerbMed Pharmacology*. 2013; 2(2): 45-48.
205. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*. 2003; 63: 5821-5828.
206. Singh S, Arcaroli J, Chen Y, Thompson DC, Messersmith W, Jimeno A, Vasiliou V. ALDH1B1 is crucial for colon tumorigenesis by modulating Wnt/ β -catenin, Notch and PI3K/Akt signaling pathways. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0121648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121648>
207. Song Y, Ye M, Zhou J, Wang Z, Zhu X. Targeting E-cadherin expression with small molecules for digestive cancer treatment. *American Journal of Translational Research*. 2019; 11(7): 3932-44.
208. Spannhoff A, Kim YK, Raynal NJ, Gharibyan V, Su MB, Zhou YY, Li J, Castellano S, Sbardella G, Issa JP, Bedford MT. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Reports*. 2011; 12(3): 238-43. doi: 10.1038/embor.2011.9
209. Sreepadmanabh M, Toley BJ. Investigations into the cancer stem cell niche using in-vitro 3-D tumor models and microfluidics. *Biotechnology Advances*. 2018; 36(4): 1094-1110. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.009
210. Staneva R, El Marjou F, Barbazan J, Krndija D, Richon S, Clark AG, Vignjevic DM. Cancer cells in the tumor core exhibit spatially coordinated migration patterns. *Journal of Cell Science*. 2019; 132(6): jcs220277. doi: 10.1242/jcs.220277
211. Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *Journal of Cell Biology*. 2001; 154(6): 1185-96. doi: 10.1083/jcb.200104036
212. Sugiyama T, Takahashi K, Mori H. Royal jelly acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, as a modulator of the innate immune responses. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 2012; 12: 368-376. doi: 10.2174/187153012803832530
213. Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, Yamada Y, Narita Y, Ohta S, Araki Y, Miyata T, Mishima S. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008; 5: 295-302. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem036>
214. Szarynska M, Olejniczak A, Kobiela J, Szychalski P, Kmiec Z. Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer (Review). *Oncology Letters*. 2017; 14: 7653-7668. doi: 10.3892/ol.2017.7261
215. Šeklić DS, Stanković MS, Milutinović MG, Topuzović MD, Štajn AŠ, Marković SD. Cytotoxic, antimigratory, pro-and antioxidative activities of extracts medical

- mushrooms on colon cancer cell lines. *Archives of Biological Sciences*. 2016; 68(1): 93-105. <https://doi.org/10.2298/ABS150427131S>
216. Šeklić D. Molekularni mehanizmi migracije ćelija karcinoma kolona u antitumorskom delovanju novosintetisanih platina(IV) kompleksa i prirodnih bioaktivnih supstanci. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2018.
217. Šeklić DS, Obradović AD, Stanković MS, Živanović MN, Mitrović TL, Stamenković SM, et al. Proapoptotic and antimigratory effects of Pseudevernia furfuracea and Platismatia glauca on colon cancer cell lines. *Food Technology and Biotechnology*. 2018; 56(3): 421-430. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5727>
218. Šeklić DS, Đukić T, Milenković D, Jovanović MM, Živanović MN, Marković Z, Filipović N. Numerical modelling of WNT/ β -catenin signal pathway in characterization of EMT of colorectal carcinoma cell lines after treatment with Pt(IV) complexes. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2022; 226: 107158. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2022.107158>
219. Šeklić DS, Jovanović MM, Virijević KD, Grujić JN, Živanović MN, Marković SD. Pseudevernia furfuracea inhibits migration and invasion of colorectal carcinoma cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022; 284: 114758. doi: 10.1016/j.jep.2021.114758
220. Tahtamouni L, Ahram M, Koblinski J, Rolfo C. Molecular regulation of cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*. 2019; 2019: 1356508. doi: 10.1155/2019/1356508
221. Takahashi T, Shiraishi A. Stem cell signaling pathways in the small intestine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 2032. <https://doi.org/10.3390/ijms21062032>
222. Tam WL, Lim B. Genome-wide transcription factor localization and function in stem cells. *StemBook*. 2008; 1-32. doi: 10.3824/stembook.1.19.1
223. Tamura S, Isobe T, Ariyama H, Nakano M, Kikushige Y, Takaishi S, Kusaba H, Takenaka K, Ueki T, Nakamura M, Akashi K, Baba E. E-cadherin regulates proliferation of colorectal cancer stem cells through NANOG. *Oncology Reports*. 2018; 40(2): 693-703. doi: 10.3892/or.2018.6464
224. Tang S, Han H, Bajic VB. ERGDB: estrogen responsive genes database. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32: D533–D536.
225. Tang Y, Weiss SJ. Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation. *Cell Cycle*. 2017; 16(5): 399-405. doi: 10.1080/15384101.2017.1280643
226. Tape CJ. The heterocellular emergence of colorectal cancer. *Trends in Cancer*. 2017; 3(2): 79-88. doi: 10.1016/j.trecan.2016.12.004

227. Taracha-Wisniewska A, Kotarba G, Dworkin S, Wilanowski T. Recent discoveries on the involvement of Krüppel-like factor 4 in the most common cancer types. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 8843. <https://doi.org/10.3390/ijms21228843>
228. Telloni SM. Tumor staging and grading: a primer. *Molecular Profiling*. 2017; 1–17. doi:10.1007/978-1-4939-6990-6_1
229. Terada Y, Narukawa M, Watanabe T. Specific hydroxy fatty acids in royal jelly activate TRPA1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59(6): 2627–35. doi: 10.1021/jf1041646
230. Toledo-Guzmán ME, Hernández MI, Gómez-Gallegos ÁA, Ortiz-Sánchez E. ALDH as a stem cell marker in solid tumors. *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 14(5): 375–388. doi: 10.2174/1574888X13666180810120012
231. Townsend GF, Morgan JF, Hazlett B. Activity of 10-hydroxydecanoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours. *Nature*. 1959; 183: 1270–1271.
232. Townsend GF, Morgan JF, Tolnai S, Hazlett B, Morton HJ, Shuel RW. Studies on the *in vitro* antitumor activity of fatty acids I. 10-hydroxy-2-decanoic acid from royal jelly. *Cancer Research*. 1960; 20: 503–510.
233. Tsochantaridis I, Roupas A, Mohlin S, Pappa A, Voulgaridou G-P. The concept of cancer stem cells: elaborating on ALDH1B1 as an emerging marker of cancer progression. *Life*. 2023; 13(1): 197. <https://doi.org/10.3390/life13010197>
234. Tuch BE. Stem cells. A clinical update. *Australian Family Physician*. 2006; 35(9): 719–721.
235. Turano M, Costabile V, Cerasuolo A, Duraturo F, Liccardo R, Delrio P, Pace U, Rega D, Dodaro CA, Milone M, Izzo P, De Rosa M. Characterisation of mesenchymal colon tumour-derived cells in tumourspheres as a model for colorectal cancer progression. *International Journal of Oncology*. 2018; 53: 2379–2396. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4565>
236. Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*. 2020; 25(22): 5243. doi: 10.3390/molecules25225243
237. Valcz G, Sipos F, Krenacs T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Toth K, Wichmann B, Molnar B, Tulssay Z. Increase of α -SMA+ and CK+ cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis. *Pathology & Oncology Research*. 2012; 18(2): 371–76. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9454-z>
238. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO Journal*. 2012; 31(12): 2714–36. doi: 10.1038/emboj.2012.150

239. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(6): 717-728. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.007
240. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*. 2008; 73(9): R117-24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x
241. Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in colorectal cancer: a culprit in metastasis. *Cancers*. 2017; 9: 1-22. <https://doi.org/10.3390/cancers9120171>
242. Wahab SMR, Islam F, Gopalan V, Lam AK. The identifications and clinical implications of cancer stem cells in colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2017; 16(2): 93-102. doi: 10.1016/j.clcc.2017.01.011
243. Walcher L, Kistenmacher A-K, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, Blaudszun A-R, Yevsa T, Fricke S and Kossatz-Boehlert U. Cancer stem cells—origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 1280. doi: 10.3389/fimmu.2020.01280
244. Wang K, Xu J, Zhang J, Huang J. Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2012; 12: 573. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-573>
245. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The role of Snail in EMT and tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*. 2013; 13(9): 963-972. <https://doi.org/10.2174/15680096113136660102>
246. Wang X, Li H, Lu X, Wen C, Huo Z, Shi M, Tang X, Chen H, Peng C, Fang Y, Deng X, Shen B. Melittin-induced long non-coding RNA NONHSAT105177 inhibits proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*. 2018; 9(10): 940. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0965-3>
247. Wang M, Liu X, Chen T, Cheng X, Xiao H, Meng X, Jiang Y. Inhibition and potential treatment of colorectal cancer by natural compounds via various signaling pathways. *Frontiers in Oncology*. 2022; 12: 956793. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.956793>
248. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier J-M, Fajloun Z. Bee venom: overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*. 2019; 24(16): 2997. <https://doi.org/10.3390/molecules24162997>
249. Weinberg RA. The biology of cancer. 2nd ed., Garland Science, New York and London, 2014.
250. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer Letters*. 2016; 372(1): 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.12.009>

251. Wong IY, Javaid S, Wong EA, Perk S, Haber DA, Toner M, Irimia D. Collective and individual migration following the epithelial-mesenchymal transition. *Nature Materials*. 2014; 13(11): 1063-71. doi: 10.1038/nmat4062
252. Wu H, Sun Y. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatric Research*. 2006; 59: 21–25. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000203565.76028.2a>
253. Wu JS, Jiang J, Chen BJ, Wang K, Tang YL, Liang XH. Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology*. 2021; 14(1): 100899. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100899
254. Wytrychowski M, Chenavas S, Gaelle D, Herve' C, Magali B, Guibert S, Brion B. Physicochemical characterisation of French royal jelly: comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013; 29: 126–133.
255. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*. 2005; 17(5): 559-64. doi: 10.1016/j.ceb.2005.08.002
256. Yang YC, Chou WM, Widowati DA, Lin IP, Peng CC. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018; 18: 202. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2267-9>
257. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Molecular Cancer Research*. 2011; 9(12): 1608-20. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0568
258. Yao C, Su L, Shan J, Zhu C, Liu L, Liu C, Xu Y, Yang Z, Bian X, Shao J, Li J, Lai M, Shen J, Qian C. IGF/STAT3/NANOG/Slug signaling axis simultaneously controls epithelial-mesenchymal transition and stemness maintenance in colorectal cancer. *Stem Cells*. 2016; 34(4): 820–31. <https://doi.org/10.1002/stem.2320>
259. Yao X, Zeng Y. Tumour associated endothelial cells: origin, characteristics and role in metastasis and anti-angiogenic resistance. *Frontiers in Physiology*. 2023; 14: 1199225. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1199225>
260. Yasuda T, Ishioto T, Baba H. Conflicting metabolic alterations in cancer stem cells and regulation by the stromal niche. *Regenerative Therapy*. 2021; 17: pp. 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.005>
261. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 2016; 21(5): 559. doi: 10.3390/molecules21050559
262. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *American Journal of Stem Cells*. 2014; 3(2): 74-82.
263. Zhai W, Jeong H, Cui L, Kraine D, Tjian R. In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell*. 2005; 123(7): 1241-1253. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.030

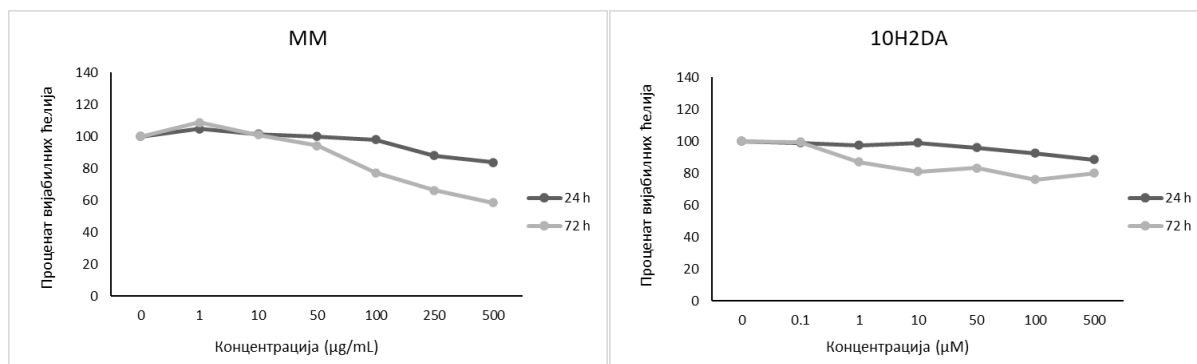
264. Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(12): 9180–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077958>
265. Zhang Y, Chen Y, Huang J, Wu X, Tang R, Huang Q, Xu Y, Peng X, Fu K, Xiao S. Mucinous histology is associated with poor prognosis in locally advanced colorectal adenocarcinoma treated with postoperative first-line adjuvant chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology*. 2022; 48(10): 2075–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2022.06.024>
266. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012; 17(6): 6196–236. doi: 10.3390/molecules17066196
267. Zhao GX, Xu YY, Weng SQ, Zhang S, Chen Y, Shen XZ, Dong L, Chen S. CAPS1 promotes colorectal cancer metastasis via Snail mediated epithelial mesenchymal transformation. *Oncogene*. 2019; 38(23): 4574–4589. doi: 10.1038/s41388-019-0740-7
268. Zhao T, McMahon M, Reynolds K, Saha SK, Stokes A, Zhou CJ. The role of Lrp6-mediated Wnt/ β -catenin signaling in the development and intervention of spinal neural tube defects in mice. *Disease Models and Mechanisms*. 2022; 15(6): dmm049517. doi: 10.1242/dmm.049517
269. Zheng S, Schrijvers JJA, Greuter MJW, Kats-Ugurlu G, Lu W, de Bock GH. Effectiveness of colorectal cancer (CRC) screening on all-cause and CRC-specific mortality reduction: a systematic review and meta-analysis. *Cancers*. 2023; 15(7): 1948. <https://doi.org/10.3390/cancers15071948>
270. Zhou J, Zhao J, Yuan H, Meng Y, Li Y, Wu L, Xue X. Comparison of UPLC and HPLC for determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in royal jelly by ultrasound-assisted extraction with internal standard. *Chromatographia*. 2007; 66: 185–190.
271. Zucchini-Pascal N, Peyre L, Rahmani R. Crosstalk between Beta-Catenin and Snail in the Induction of Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocarcinoma: Role of the ERK1/2 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(10): 20768–20792. <https://doi.org/10.3390/ijms141020768>
272. Živančević Simonović S. Opšta patološka fiziologija. Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Kragujevac, 2002.

КОРИШЋЕНЕ ИНТЕРНЕТ СТРАНИЦЕ:

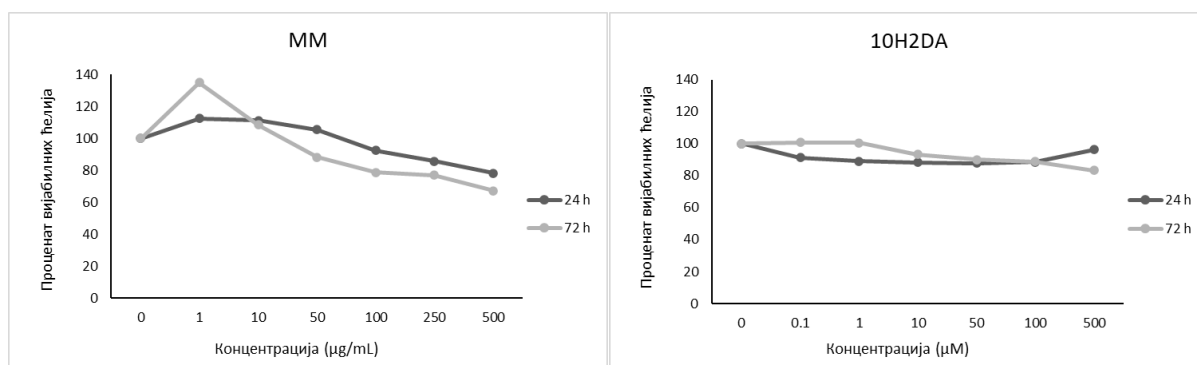
1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5452924/>
2. [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(11\)00184-3/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(11)00184-3/fulltext)
3. <https://www.frontiersin.org/>
4. <https://gut.bmj.com/content/62/9/1315>
5. <https://www.sciencedirect.com/>
6. <https://sr.wikipedia.org/>
7. <https://gco.iarc.fr/today/home>
8. <https://www.atcc.org/products/ccl-247>

8. ПРИЛОЗИ

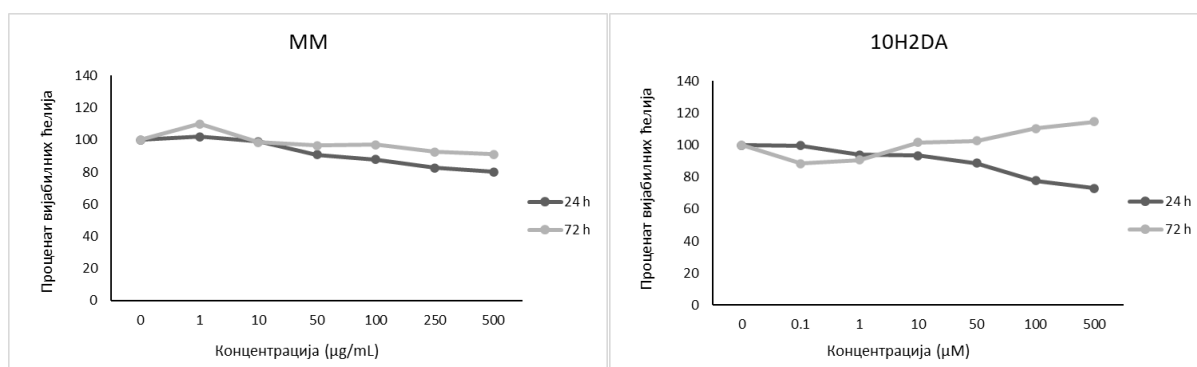
Прилог 1. Вијабилност SW-480, НСТ-116 и МРС-5 ћелија у третманима ММ-ом и 10Н2ДА.



Графикон прилог 1. Ефекти третмана на вијабилност SW-480 ћелија.



Графикон прилог 2. Ефекти третмана на вијабилност НСТ-116 ћелија.



Графикон прилог 3. Ефекти третмана на вијабилност МРС-5 ћелија.

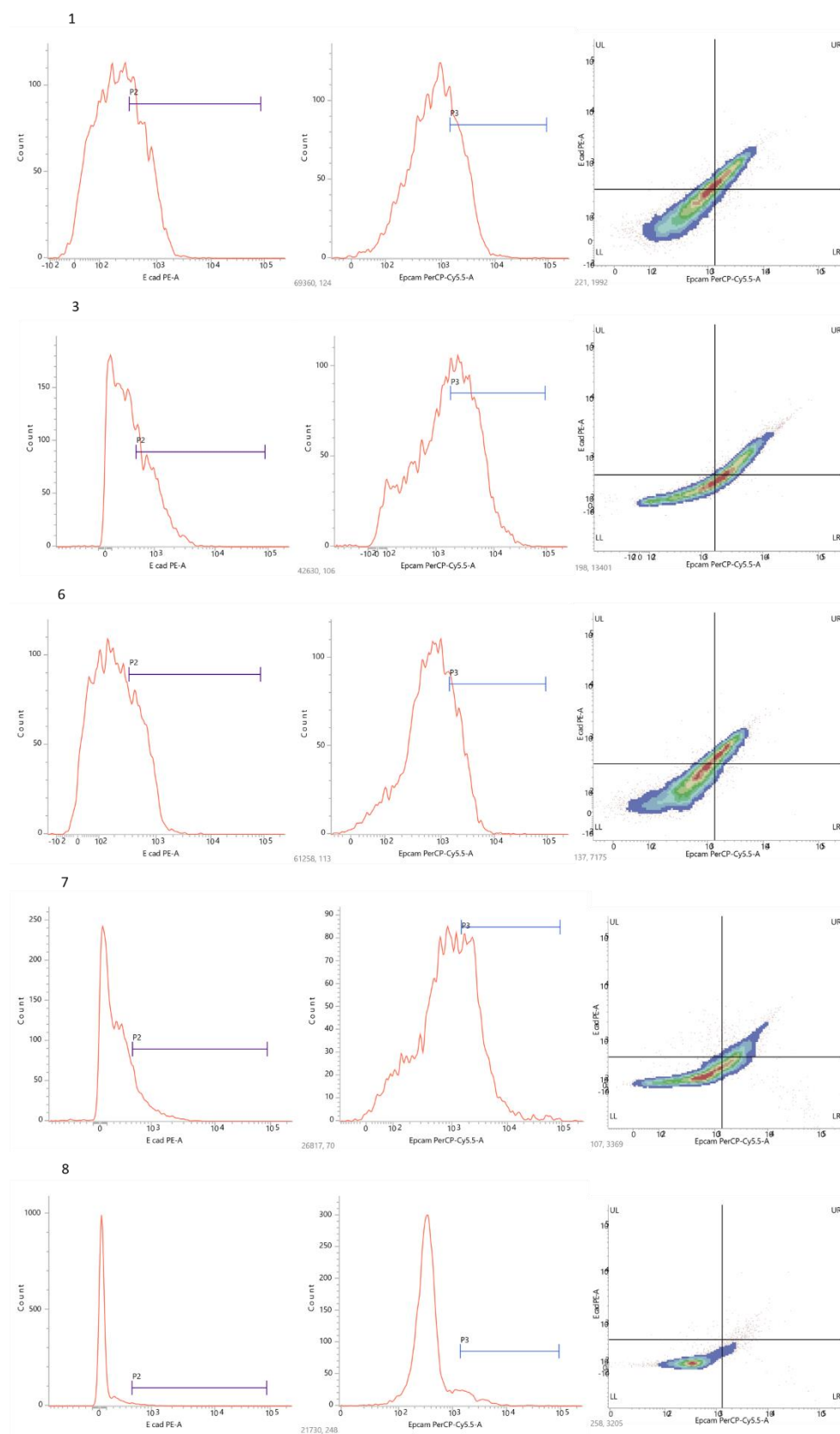
Прилог 2. Класификација ткивних узорака.**Табела прилог 1.** Клиничко-патолошке карактеристике пацијената оболелих од колоректалног карцинома

Ознака узорка	Пол	Године	РН налаз	Хистолошки тип	Детектована метастаза на јетри	Стадијум колоректалног карцинома
1	женски	66	Инвазивни аденокарцином	Средње диферентован	не	I
2	мушки	44	Инвазивни аденокарцином	Средње диферентован	не	IV
3	мушки	59	Интрамукозални аденокарцином	Средње диферентован	не	I
4	мушки	73	Инвазивни аденокарцином	Средње диферентован	да	IV
5	мушки	59	Инвазивни аденокарцином	Средње диферентован	не	IV
6	женски	69	Инвазивни аденокарцином	Добро диферентован	не	I
7	мушки	71	Интрамукозални аденокарцином	Добро диферентован	не	I
8	женски	63	Интрамукозални аденокарцином	Добро диферентован	не	I
9	мушки	54	Муцинозни аденокарцином	Добро диферентован	не	III
10	женски	79	Интрамукозални аденокарцином	Добро диферентован	не	IV

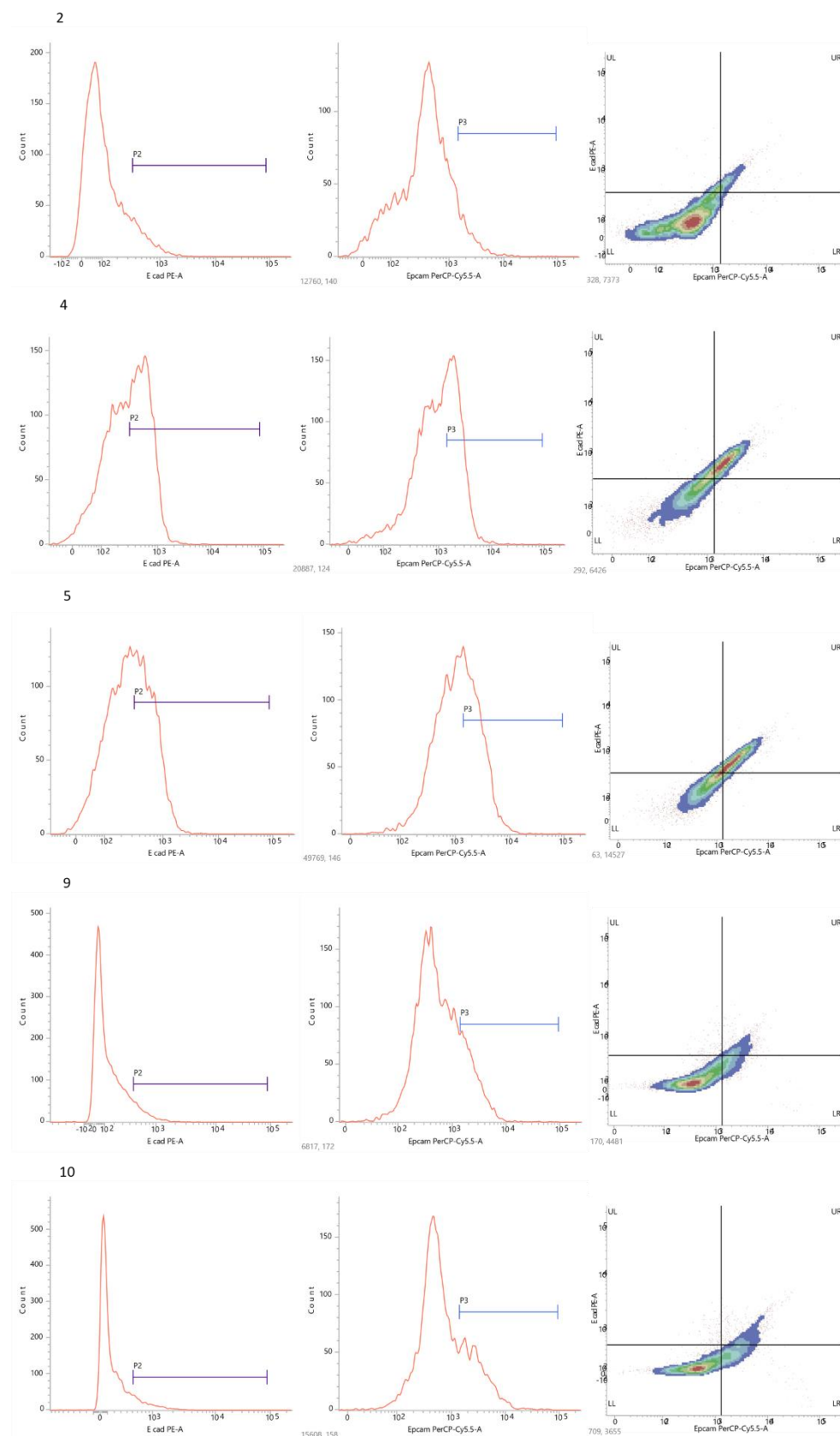
Табела прилог 2. TNM класификација и опис тестираних узорака

Ознака узорка	TNM класификација	Опис
1	T2N0M0	Тумор лоциран у слоју muscularis propria, без присуства у регионалним лимфним чворовима, без детектованих метастаза
2	T3N3M1	Захваћеност свих слојева тумором, тумор детектован у апикалним и васкуларним „trunk“ лимфним чворовима, детектоване метастазе
3	T1N0M0	Тумор лоциран у субукози, без присуства у регионалним лимфним чворовима, без детектованих метастаза
4	/	/
5	T3N1M1	Захваћеност свих слојева тумором, тумор детектован у 1-3 регионална лимфна чвора, детектоване метастазе
6	T1N0M0	Тумор лоциран у субукози, без присуства у регионалним лимфним чворовима, без детектованих метастаза
7	T2N0M0	Тумор лоциран у слоју muscularis propria, без присуства у регионалним лимфним чворовима, без детектованих метастаза
8	T2N0M0	Тумор лоциран у слоју muscularis propria, без присуства у регионалним лимфним чворовима, без детектованих метастаза
9	T4N1M0	Захваћеност придружених органа или перитонеума тумором, тумор детектован у апикалним и васкуларним „trunk“ лимфним чворовима, без детектованих метастаза
10	T1N1M1	Тумор лоциран у субукози, детектован у 1-3 регионална лимфна чвора, детектоване метастазе

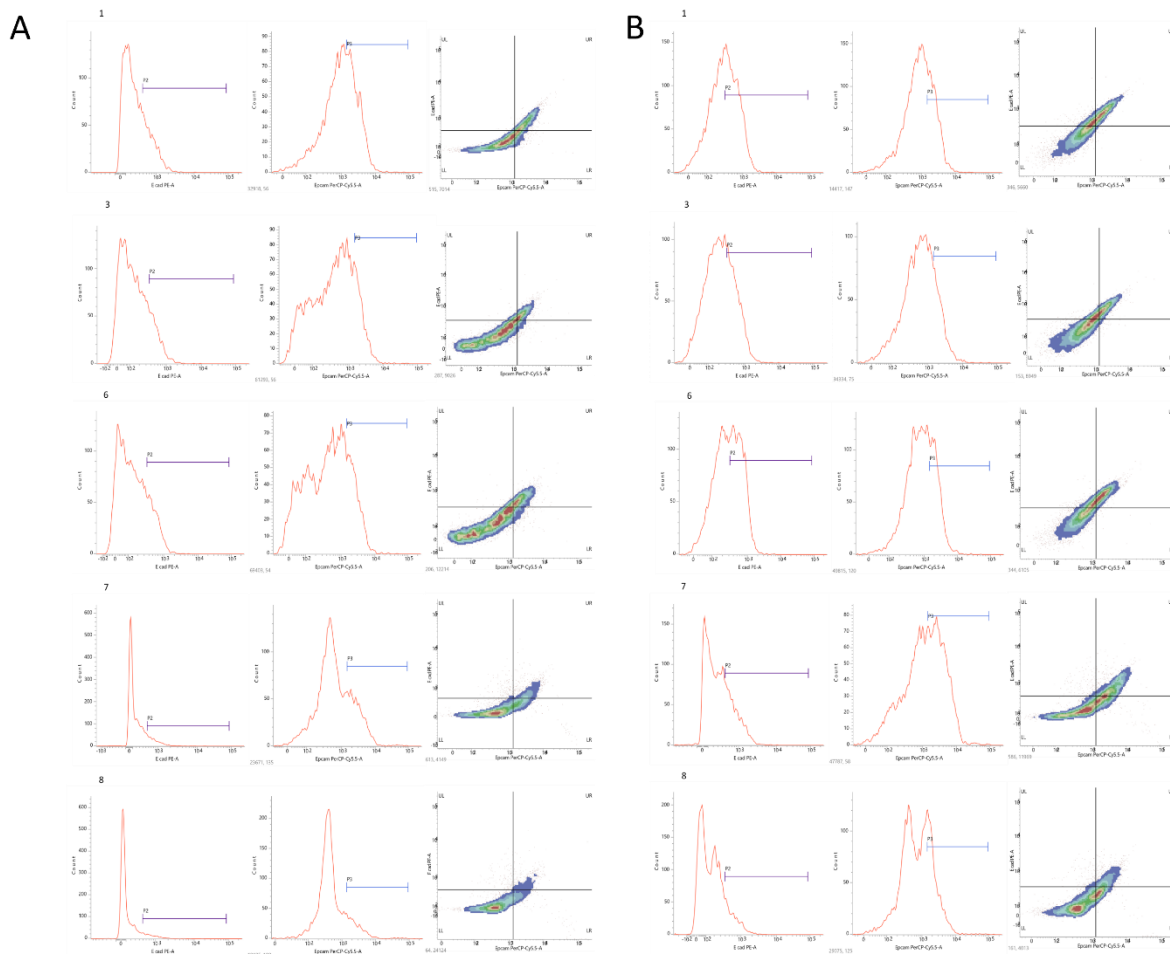
Прилог 3. Фенотипска карактеризација ткивних узорака.



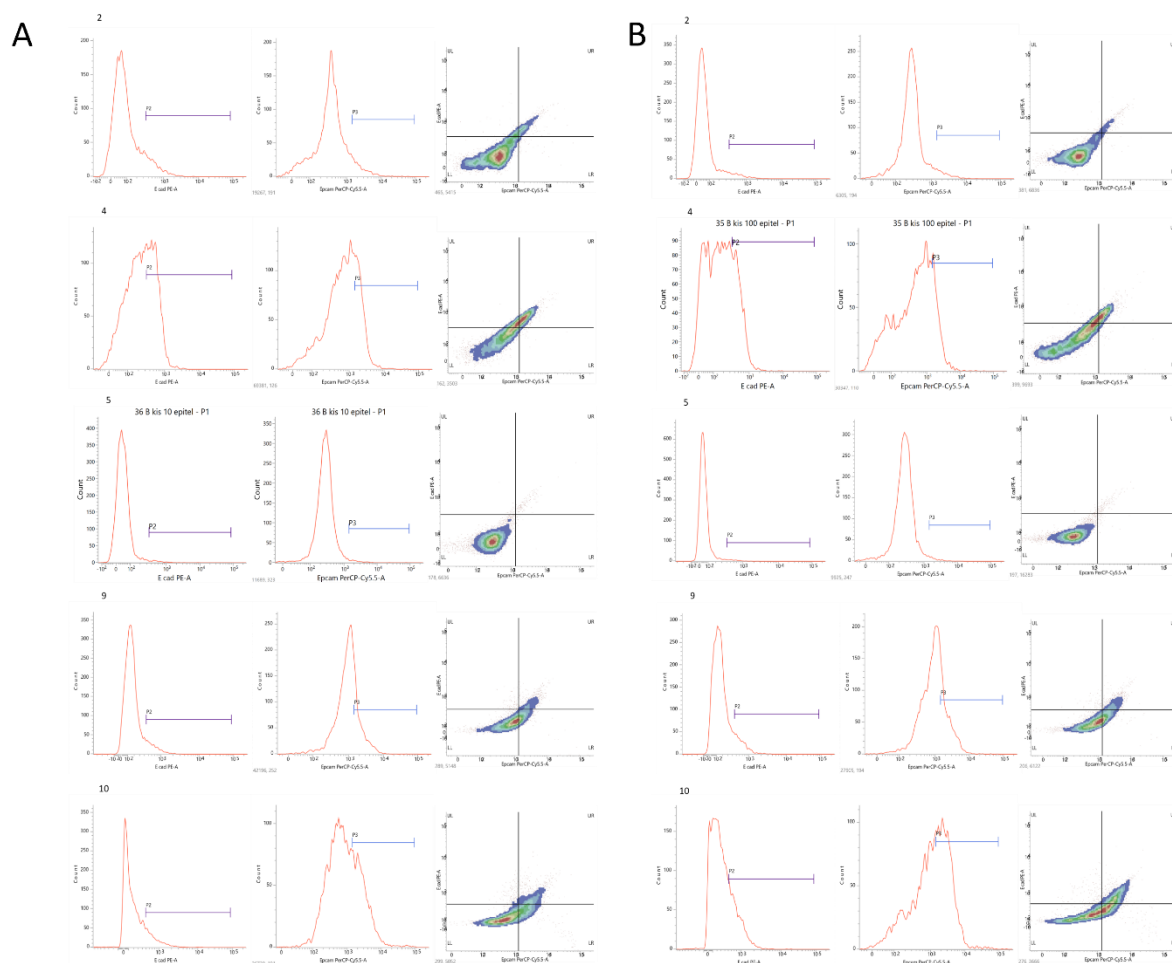
Графикон прилог 4. Карактеризација епителног фенотипа контролних ткивних узорака почетних стадијума методом проточне цитометрије.



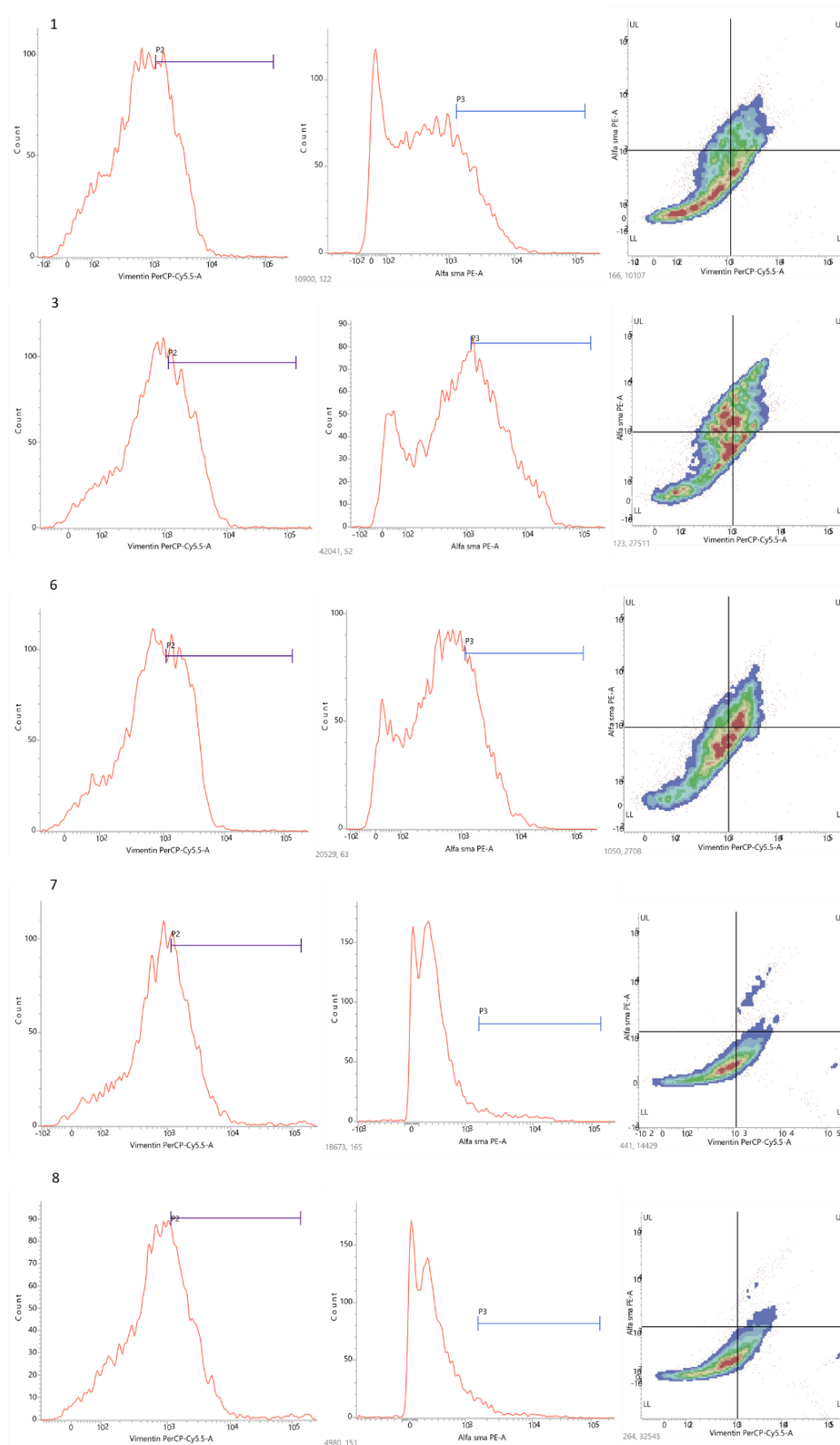
Графикон прилог 5. Карактеризација епителног фенотипа контролних ткивних узорака напредних стадијума методом проточне цитометрије.



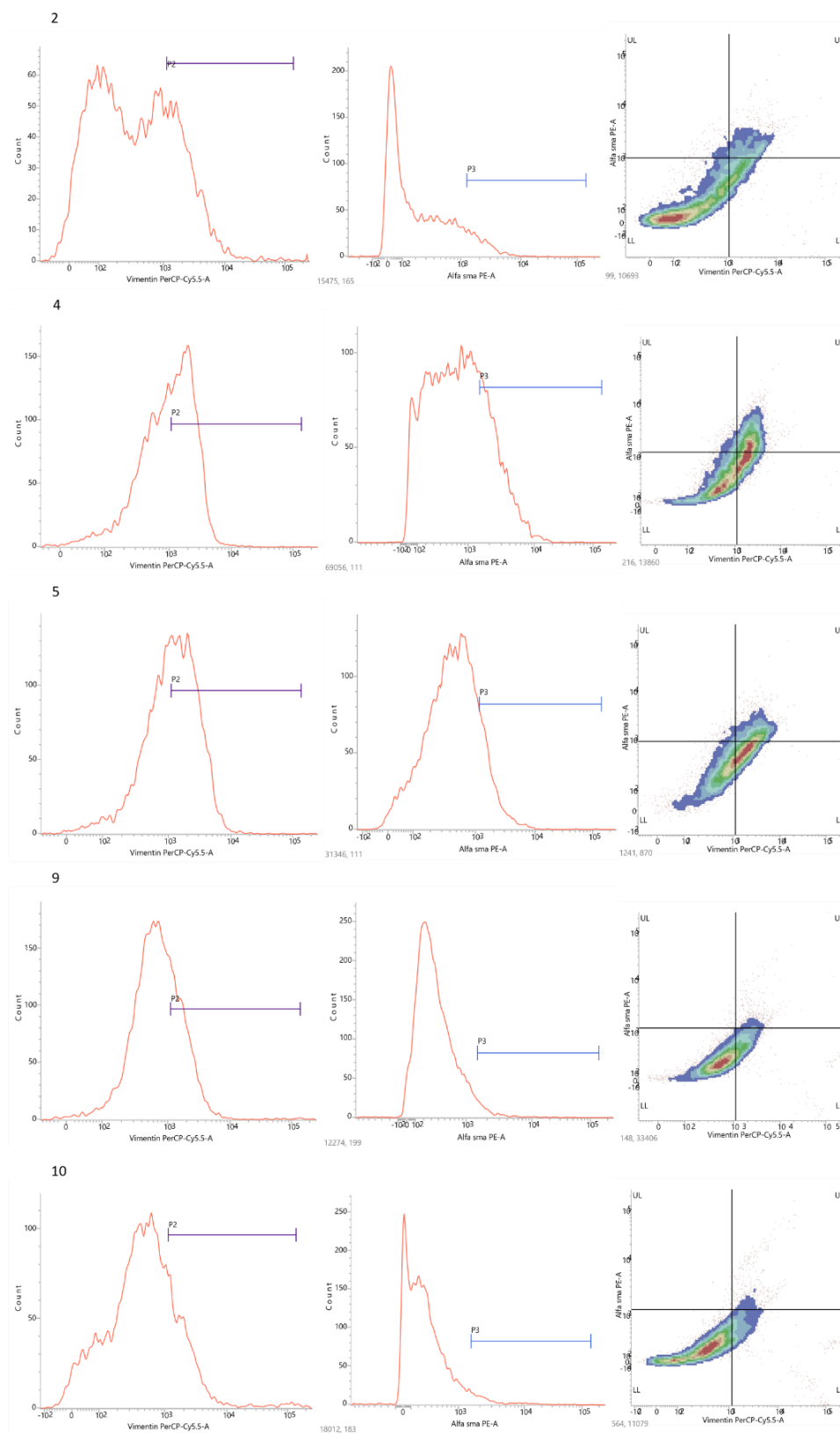
Графикон прилог 6. Карактеризација епителног фенотипа ткивних узорака почетних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μM (A) и концентрације 100 μM (концентрације 10 μM (B), методом проточне цитометрије.



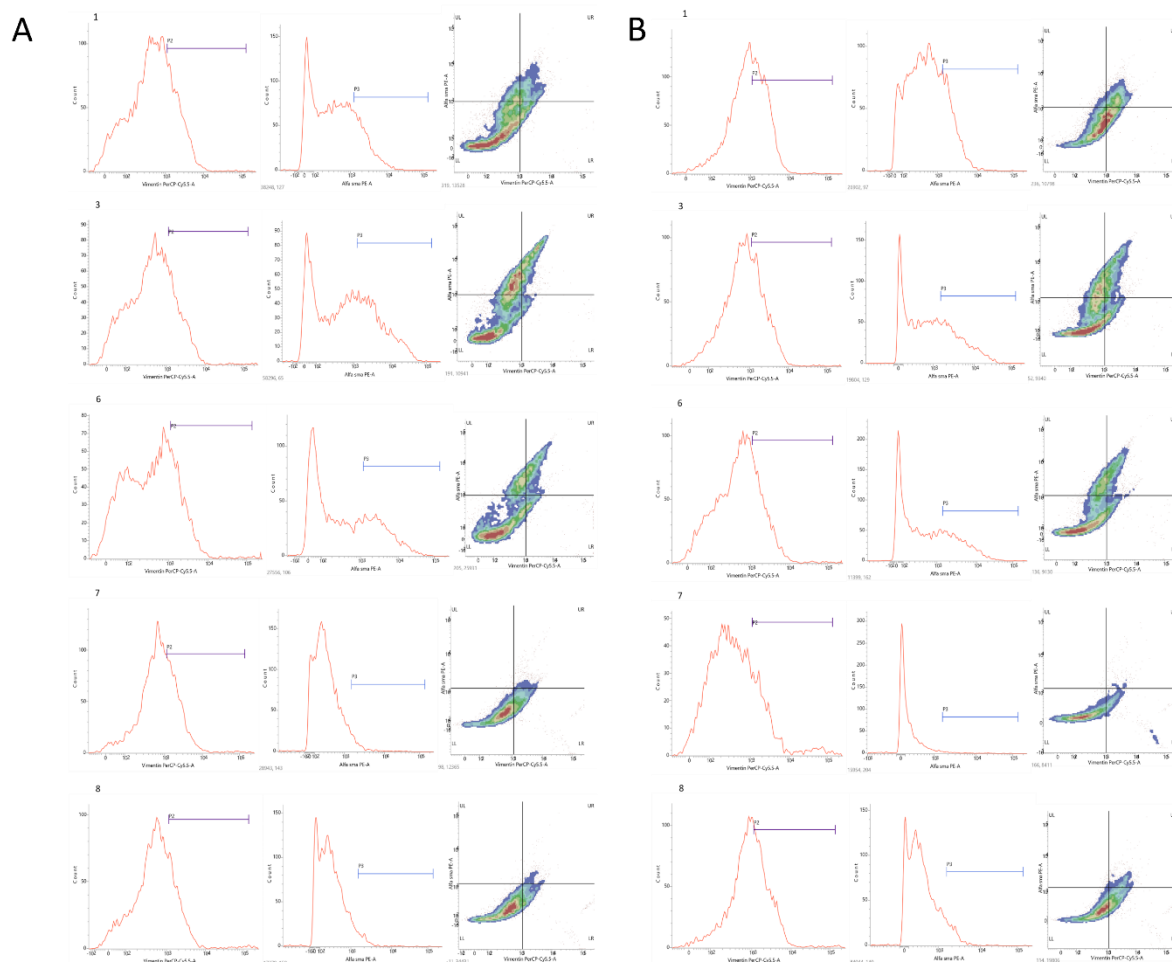
Графикон прилог 7. Карактеризација епителног фенотипа ткивних узорака напредних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μ M (A) и концентрације 100 μ M (концентрације 10 μ M (B), методом проточне цитометрије.



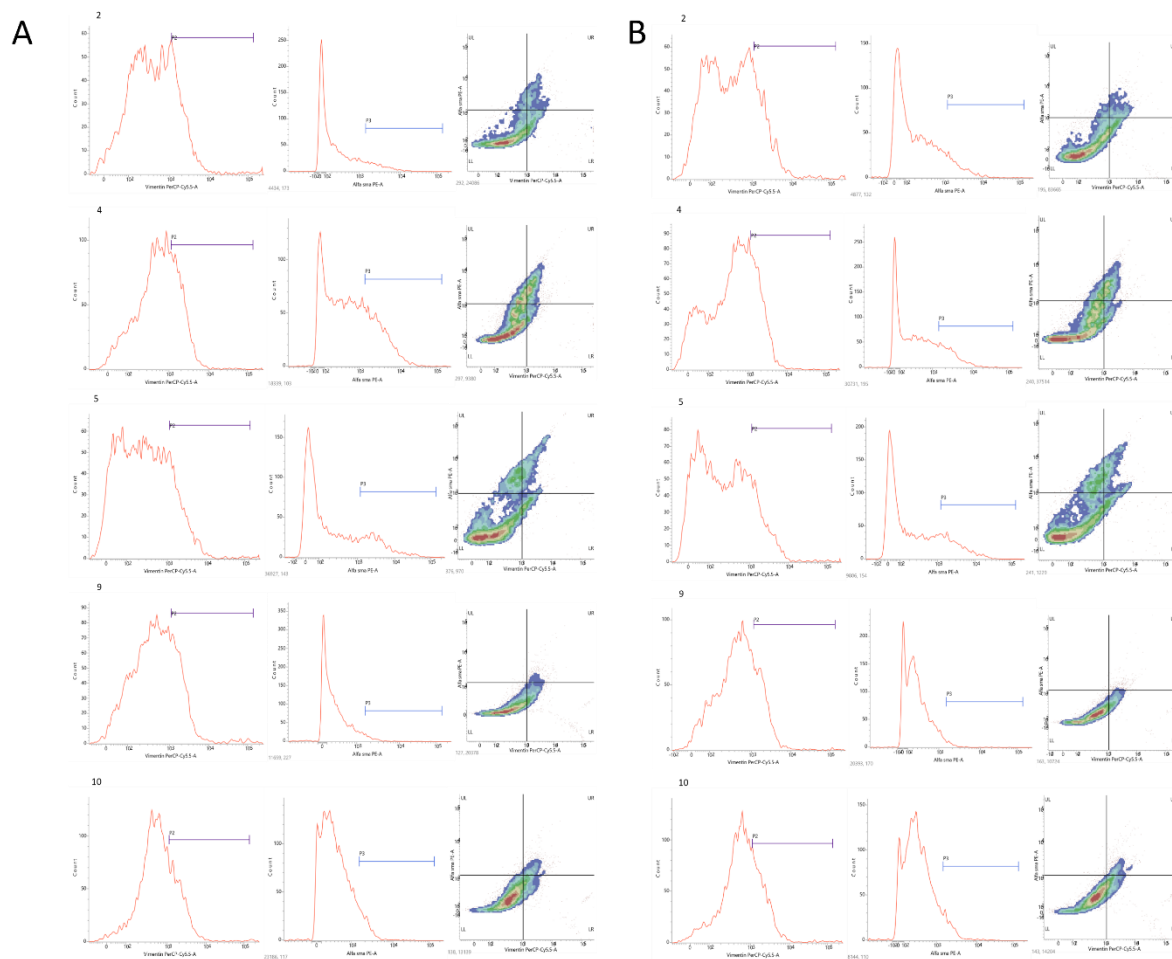
Графикон прилог 8. Карактеризација мезенхимског фенотипа контролних ткивних узорака почетних стадијума методом проточне цитометрије.



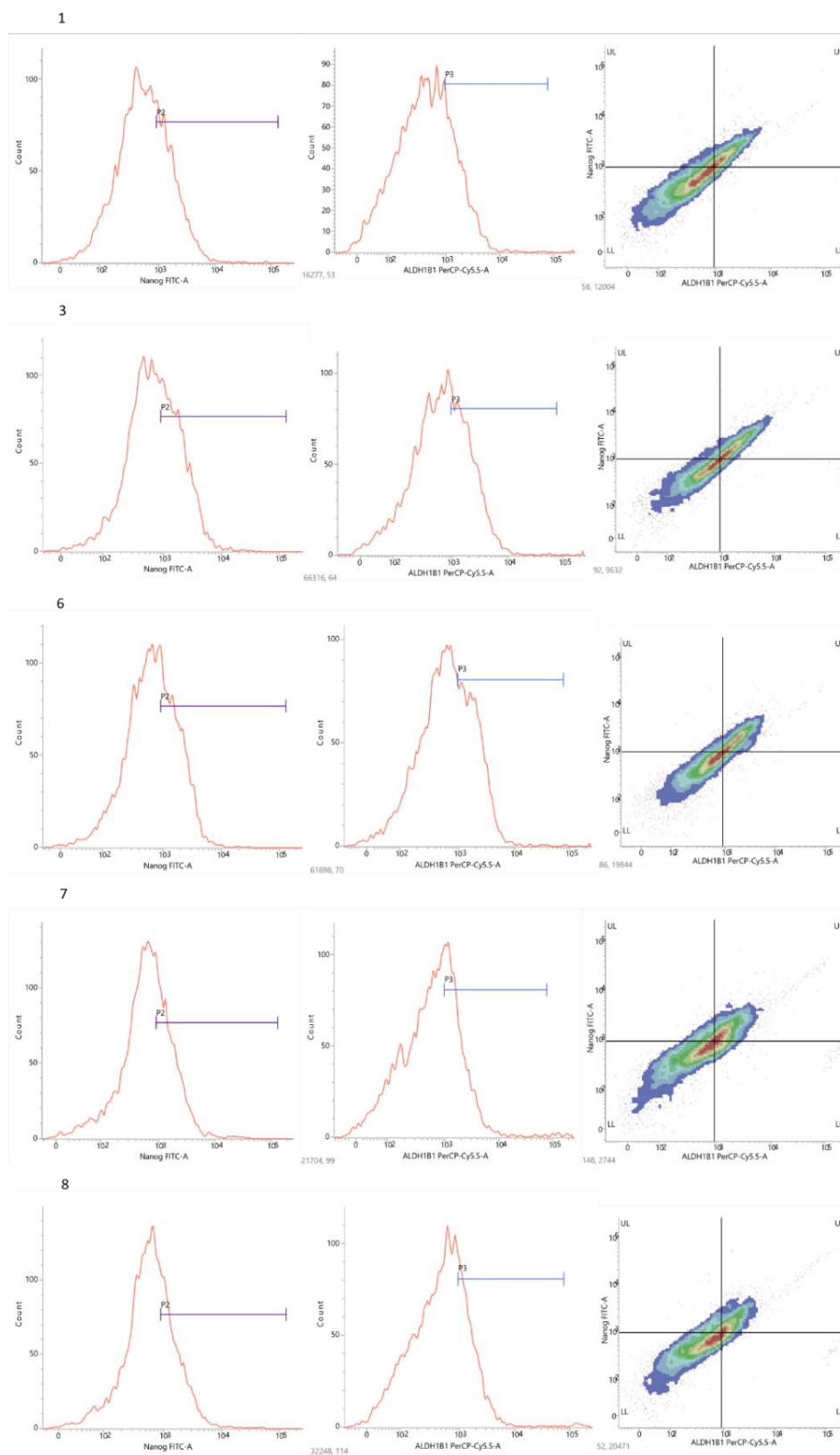
Графикон прилог 9. Карактеризација мезенхимског фенотипа контролних ткивних узорака напредних стадијума методом проточне цитометрије.



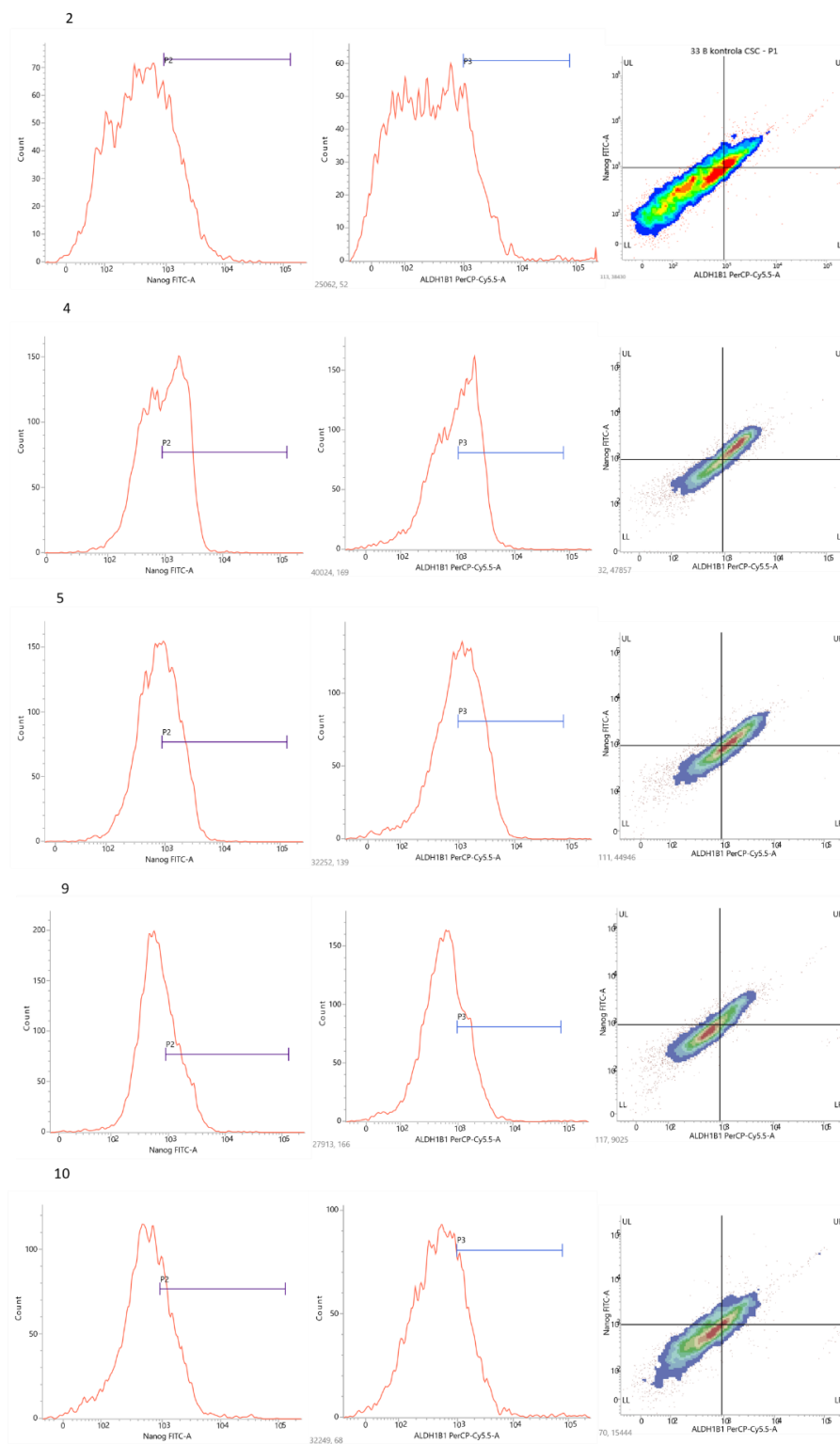
Графикон прилог 10. Карактеризација мезенхимског фенотипа ткивних узорака почетних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μ M (A) и концентрације 100 μ M (концентрације 10 μ M (B), методом проточне цитометрије.



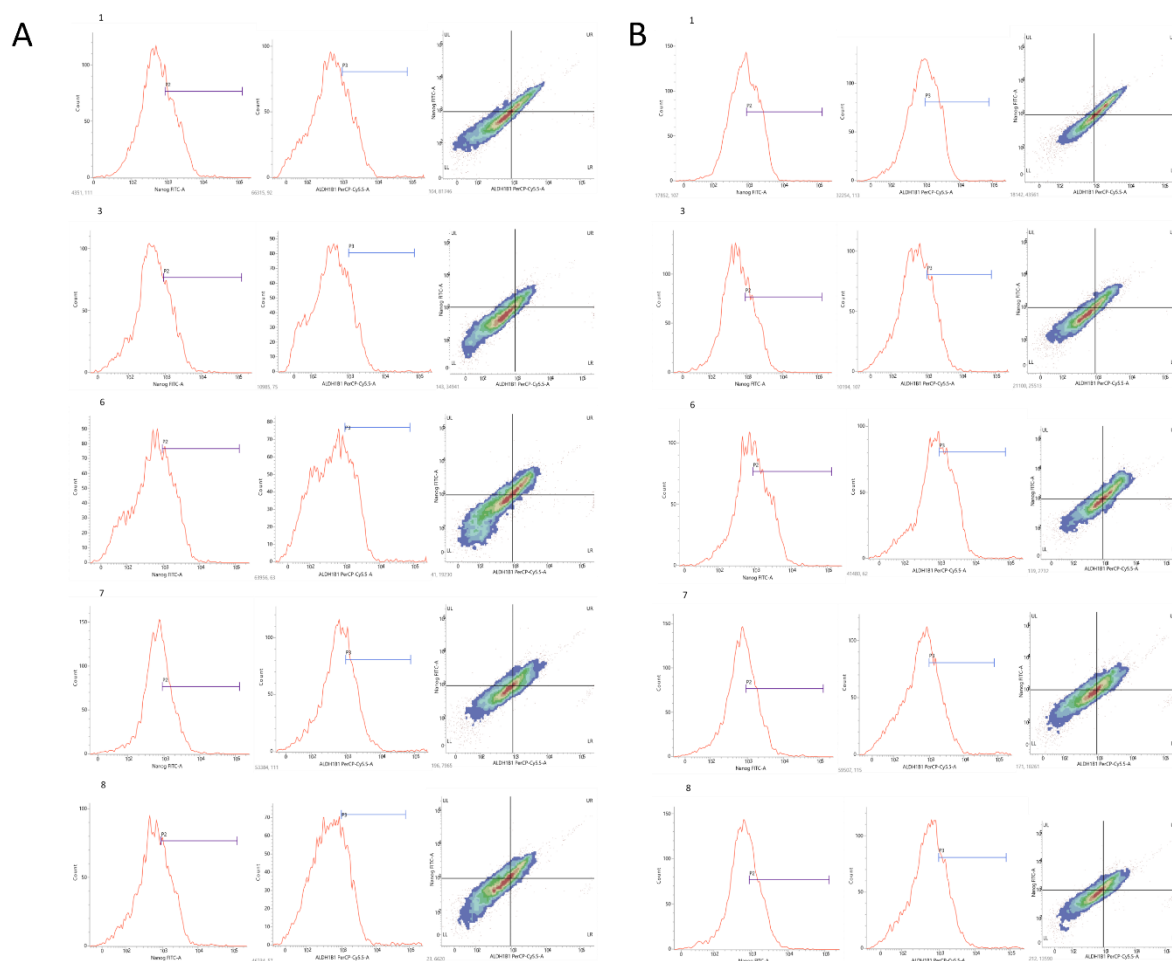
Графикон прилог 1. Карактеризација мезенхимског фенотипа ткивних узорака напредних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μ M (A) и концентрације 100 μ M (концентрације 10 μ M (B), методом проточне цитометрије.



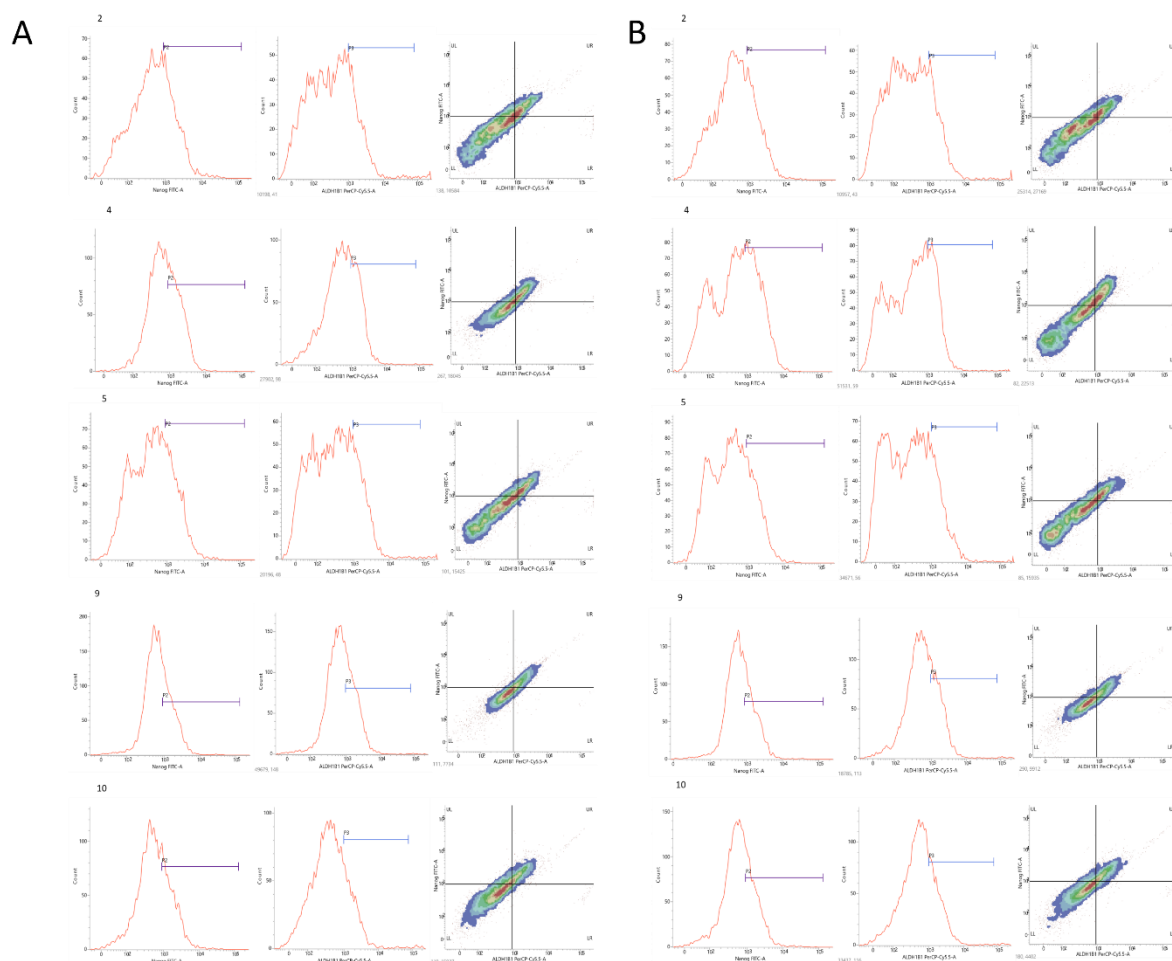
Графикон прилог 12. Карактеризација матичног фенотипа контролних ткивних узорака почетних стадијума методом проточне цитометрије.



Графикон прилог 13. Карактеризација матичног фенотипа контролних ткивних узорака напредних стадијума методом проточне цитометрије.

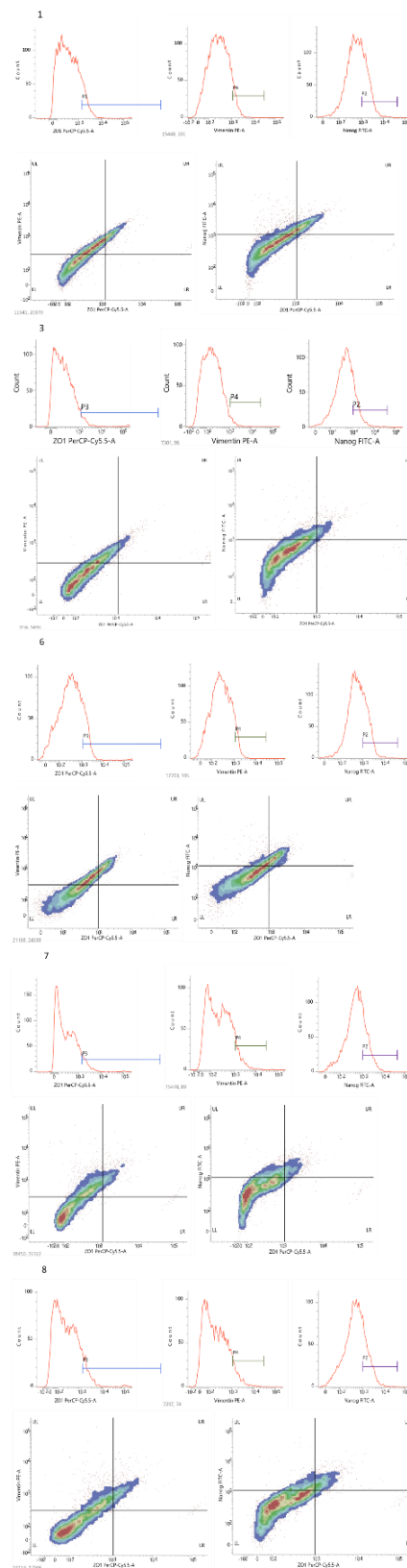


Графикон прилог 14. Карактеризација матичног фенотипа ткивних узорака почетних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μM (A) и концентрације 100 μM (концентрације 10 μM (B), методом проточне цитометрије.

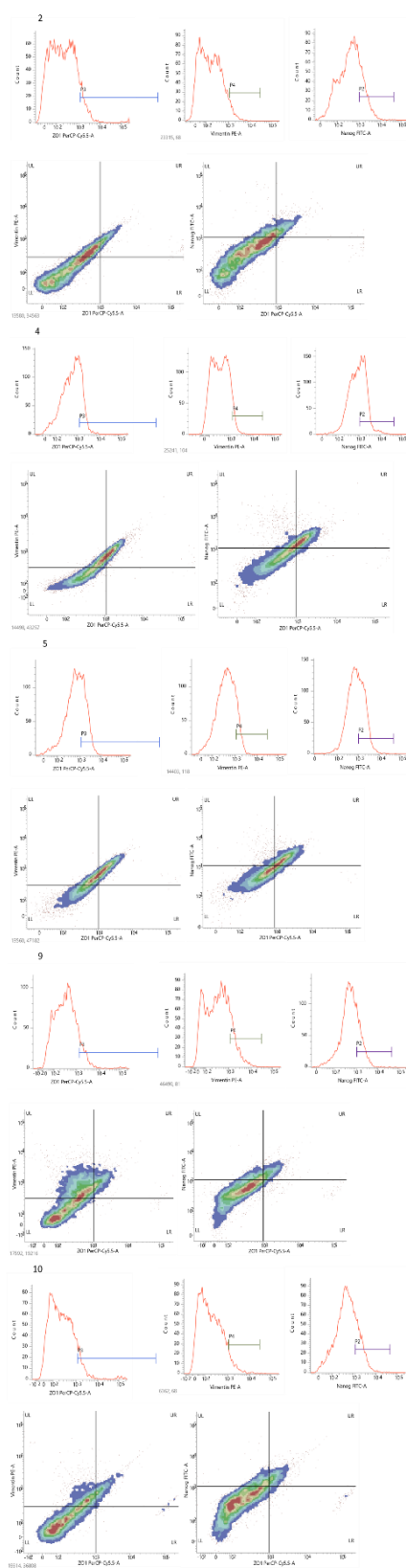


Графикон прилог15. Карактеризација матичног фенотипа ткивних узорака напредних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μM (A) и концентрације 100 μM (концентрације 10 μM (B), методом проточне цитометрије.

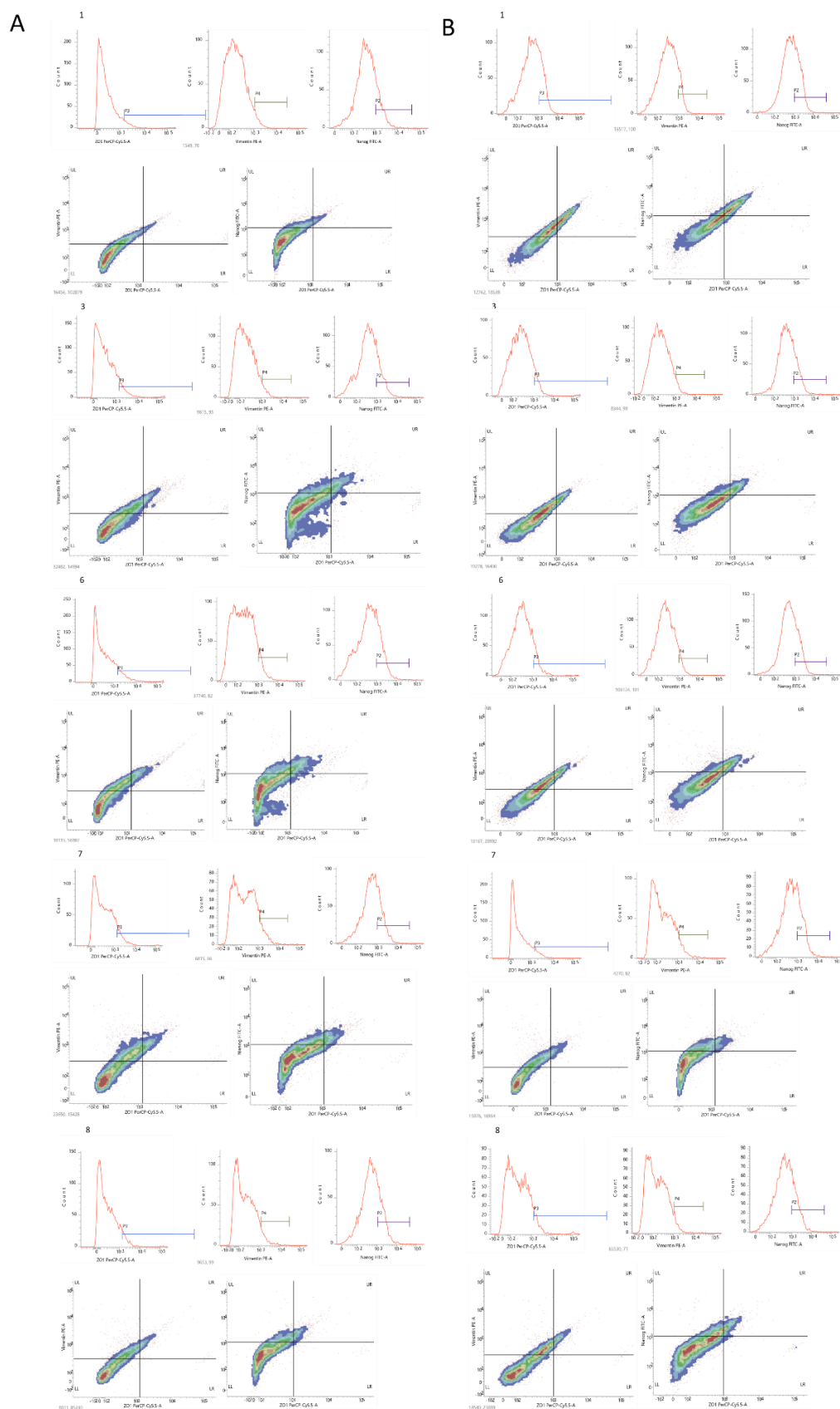
Прилог 3. Анализа најагресивнијег фенотипа ткивних узорака .



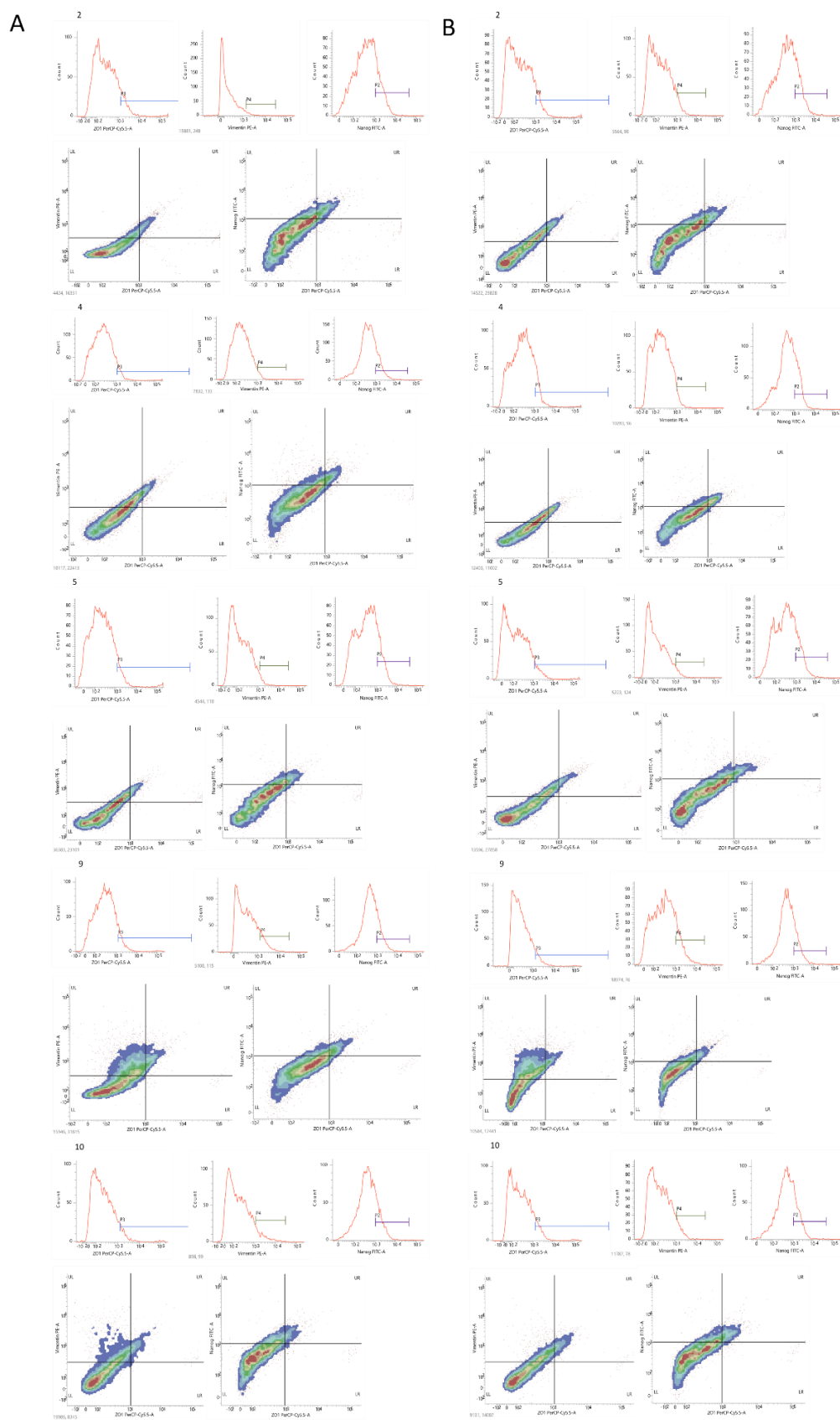
Графикон прилог 16. Анализа најагресивнијег фенотипа контролних ткивних узорака почетних стадијума методом проточне цитометрије.



Графикон прилог 17. Анализа најагресивнијег фенотипа контролних ткивних узорака напредних стадијума методом проточне цитометрије.



Графикон прилог 4. Анализа најагресивнијег фенотипа ткивних узорака почетних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μM (A) и концентрације 100 μM (концентрације 10 μM (B), методом проточне цитометрије.



Графикон прилог 19. Анализа најагресивнијег фенотипа ткивних узорака напредних стадијума третираних киселином 10H2DA концентрације 10 μM (A) и концентрације 100 μM (концентрације 10 μM (B), методом проточне цитометрије.

Садржај

1. УВОД	1
1.1. Колоректални карцином – одлике и класификација	1
1.2. Хетерогеност колоректалног карцинома на ћелијском нивоу	3
1.2.1 Епителне ћелије и маркери епителних ћелија	4
1.2.2 Фибробластне (мезенхимске) ћелије и маркери фибробласта	7
1.2.3 Остали типови ћелија у тумору	11
1.3. Матичне ћелије	13
1.3.1 Опште одлике	13
1.3.2 Матичне ћелије канцера - специфичности и улога	14
1.3.3 Тумор маркери матичних ћелија канцера	19
1.4. Механизам епително-мезенхимске транзиције	22
1.4.1 Маркери епително-мезенхимске транзиције	24
1.5. Веза ЕМТ-а и матичности - најагресивнији фенотип карциномских ћелија	27
1.6. Улога ЕМТ-а у процесима миграције и инвазије	29
1.6.1 Типови ћелијске миграције	33
1.7. Примарне ћелијске линије у преклиничким испитивањима	37
1.8. Примена природних производа у лечењу колоректалног карцинома	37
1.8.1 Матични млеч – одлике и дејство	39
1.8.2 Активна супстанца матичног млеча – транс-10-хидрокси-2- деценоична киселина (10H2DA)	41
1.8.3 Антитуморски ефекти матичног млеча и 10H2DA	42
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	45
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА	48
3.1. Хемикалије и реагенси	48
3.2. Третмани	49
3.3. Карактеризација матичног млеча	49
3.3.1 Хроматографска анализа фенолних компоненти у матичном млечу	49
3.3.2 Квантификација 10H2DA у матичном млечу	49
3.3.3 Припрема третмана	50

3.4.	Модел системи.....	51
3.4.1	Имортилизоване ћелијске линије.....	51
3.4.2	Примарна ткивна култура.....	52
3.5.	Методе коришћене у испитивањима антиканцерских ефеката третмана.....	54
3.5.1	Методе у испитивањима ефеката третмана на имортизованим ћелијским линијама.....	54
3.5.2	Методе у испитивањима ефеката третмана на ћелијама примарне ткивне културе	60
3.6.	Статистичка обрада резултата	61
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	62
4.1.	Анализа матичног млеча	62
4.1.1	Концентрација 10H2DA у узорку матичног млеча	62
4.1.2	Детектовани флавоноиди у узорку ММ-а.....	63
4.2.	Ефекат третмана на ћелијским линијама.....	63
4.2.1	Вијабилност ћелија	63
4.2.2	Ефекти третмана на типове миграције у колоректалном карциному	65
4.2.3	Ефекти третмана на инвазивни потенцијал испитиваних ћелија	72
4.2.4	Ефекти третмана на протеинску експресију маркера ЕМТ.....	73
4.2.5	Ефекти третмана на матичност ћелија.....	94
4.3.	Испитивање на ткивним узорцима колоректалног карцинома	98
4.3.1	Клиничко-патолошке карактеристике ткивних узорака	99
4.3.2	Изолација примарне ћелијске културе из ткивних узорака колоректалног карцинома и потврђивање вијабилности.....	100
4.3.3	Фенотипизација ткивних узорака колоректалног карцинома у контроли и третманима.....	101
4.3.4	Карактеризација агресивног фенотипа са аспекта ЕМТ-а у популацији епителних ћелија.....	107
5.	ДИСКУСИЈА.....	109
6.	ЗАКЉУЧЦИ	135
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	138
8.	ПРИЛОЗИ	164

Листа скраћеница

10H2DA - 10-хидрокси-транс-2-деценоична киселина

ABCG2 - ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2

ALDH1 - Aldehyde dehydrogenase 1

AMP N1 - аденозин монофосфат N1-оксид

APC - Adenomatous Polyposis Coli

AJCC - American Joint Committee on Cancer

ATCC - The American Type Culture Collection

ATP - Adenosine triphosphate

α -SMA - Alpha smooth muscle actin

BCL-2 - B-cell lymphoma 2

BMP - Bone morphogenetic protein

CCL2 - Chemokine C-C motif ligand 2

CD47 - Cluster of Differentiation 47

CRC - Колоректални карцином

CSC - Матичне ћелије канцера

CXCL12 - C-X-C motif chemokine ligand 12

DMEM - Медијум за гајење ћелија

ДНК - Дезоксирибонуклеинска киселина

DPPA - Developmental Pluripotency-associated

ESAT - Embryonic Stem Cell-Associated Transcript

EGF - Епидермални фактор раста

EMT - Епително-мезенхимска транзиција

EpCAM - Epithelial cell adhesion molecule

ER β - естрогени рецептор β

ERE - Estrogen response elements

FGFR - Fibroblast growth factor receptor

GSK3 β - Гликоген синтетаза киназе 3 β

HGF - Фактор раста хепатоцита

IL-10 - Интерлеукин 10

IL-2 - Интерлеукин 2

IL-6 - Интерлеукин 6

иРНК - информациона РНК

JAK-STAT - Janus kinases signal transducer and activator of transcription proteins

KLF4 - Krüppel-like family of transcription factor 4

LDH - Lactate dehydrogenase

LGR5 - Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5

LRP5 - LDL Receptor Related Protein 5

ММ - Матични млеч

MMP - Матрикс металопроотеиназе

MET - Мезенхимско-епителна транзиција

OCT3/4 - Octamer binding transcription factor 3/4

SALL4 - Spalt Like Transcription Factor 4

SCF - Stem Cell Factor

SOX2 - SRY (sex determining region Y)-box 2

SSEA-1 - Stage Specific Embryonic Antigens

TAF - Тумор придружени фибробласт

TCF/LEF - Т-ћелијски

фактор/лимфоцитни везујући фактор

ТЕС - Тумор инфилтриране ендотелне ћелије

TGF β - Трансформишући фактор раста бета

TME - Тумор микроокружење

TNF- α - Tumor necrosis factor- α

TNM - Tumor-nodes-metastases

UICC - Union for International Cancer Control

VEGF - Васкуларни ендотелни фактор раста

Wnt - Wingless-Integrated

ZO-1 - Zonula occludens 1

CSF-1 - Colony stimulator factor 1

Списак слика

Слика 1. Изглед матичног млеча у ћелијама саћа са ларвама.....	39
Слика 2. Изглед узорака ткива колоректалног карцинома добијених од пацијената, величине ~3 mm.....	53
Слика 3. Колективни тип миграције детектован у SW-480 ћелијској линији; А-мigrаторни фронт; Б-колективна миграција ћелија.....	66
Слика 4. Индивидуални тип миграције детектован у НСТ-116 ћелијама.....	66
Слика 5. Ефекти третмана на колективну миграцију SW-480 ћелија. Скала: 30 μ m.	67
Слика 6. Ефекти третмана на колективну миграцију НСТ-116 ћелија. Скала: 30 μ m.	68
Слика 7. Ефекти третмана на колективну миграцију MRC-5 ћелија. Скала: 30 μ m.....	69
Слика 10. Протеинска експресија цитоплазматског β -катенина у SW-480 ћелијама.	77
Слика 11. Протеинска експресија цитоплазматског β -катенина у НСТ-116 ћелијама.....	78
Слика 12. Протеинска експресија нуклеарног β -катенина у SW-480 ћелијама.....	80
Слика 13. Протеинска експресија нуклеарног β -катенина у НСТ-116 ћелијама.....	81
Слика 14. Протеинска експресија SNAIL-а у SW-480 ћелијама.	83
Слика 15. Протеинска експресија SNAIL-а у НСТ-116 ћелијама.	84
Слика 16. Протеинска експресија N-кадхерина у SW-480 ћелијама.	85
Слика 17. Протеинска експресија N-кадхерина у НСТ-116 ћелијама.	87
Слика 18. Протеинска експресија виментина у SW-480 ћелијама.....	88
Слика 20. Изглед примарне ћелијске културе изоловане из ткивних узорака колоректалног карцинома. Скала: 50 μ m.	100

Списак шема

Шема 1. Протеини у међућелијским везама.....	5
Шема 2. Положај матичних ћелија у односу на друге ћелијске типове у интестиналној крипти колона.....	15
Шема 3. Маркери матичних ћелија канцера	19
Шема 4. Шематски приказ ЕМТ и МЕТ процеса у колоректалном карциному.....	23
Шема 5. Интацелуларна локализација и функција β -катенина у ћелији	25
Шема 6. Инвазија карциномских ћелија кроз екстрацелуларни матрикс и базалну мембрану, и интравазација.....	29
Шема 7. Типови миграције карциномских ћелија; 1) појединачна и 2) колективна миграција.	34
Шема 8. Структура 10-хидрокси-2-деценичне киселине матичног млеча (Извор: https://en.wikipedia.org)	42

Списак графикана

Графикон 1. HPLC хроматограм садржаја 10H2DA детектоване у узорку ММ-а.....	62
Графикон 2. Профил фенолних компоненти у узорку ММ-а добијен употребом HPLC методе.....	63
Графикон 3. Анализа ширине пукотине у SW-480 ћелијама након третмана је приказана у виду релативне промене ширине пукотине у односу на контролу (нетретиране ћелије).....	67
Графикон 4. Анализа ширине пукотине у HCT-116 ћелијама након третмана је приказана у виду релативне промене ширине пукотине у односу на контролу (нетретиране ћелије).....	68
Графикон 5. Анализа ширине пукотине у MRC-5 ћелијама након третмана је приказана у виду релативне промене ширине пукотине у односу на контролу (нетретиране ћелије).....	69
Графикон 6. Миграторни потенцијал SW-480 ћелија.....	70
Графикон 7. Миграторни потенцијал SW-480 ћелија у контролним (нетретираним) и ћелијама третираним ММ-ом (А) и киселином 10H2DA (Б).	70
Графикон 8. Миграторни потенцијал HCT-116 ћелија.....	71
Графикон 9. Миграторни потенцијал HCT-116 ћелија у контролним (нетретираним) и ћелијама третираним ММ-ом (А) и киселином 10H2DA (Б).	71
Графикон 10. Инвазивни потенцијал SW-480 ћелија.....	72
Графикон 11. Инвазивни потенцијал HCT-116 ћелија.....	73
Графикон 12. Интензитет протеинске експресије Е-кадхерина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	74
Графикон 13. Интензитет протеинске експресије Е-кадхерина у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	76
Графикон 14. Интензитет протеинске експресије цитоплазматског β -катенина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.....	77
Графикон 15. Интензитет протеинске експресије цитоплазматског β -катенина у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.....	79
Графикон 16. Интензитет протеинске експресије нуклеарног β -катенина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.....	80
Графикон 17. Интензитет протеинске експресије нуклеарног β -катенина у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.....	82
Графикон 18. Интензитет протеинске експресије SNAIL-а у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	83
Графикон 19. Интензитет протеинске експресије SNAIL-а у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	84

Графикон 20. Интензитет протеинске експресије N-кадхерина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	86
Графикон 21. Интензитет протеинске експресије N-кадхерина у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	87
Графикон 22. Интензитет протеинске експресије виментина у SW-480 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	88
Графикон 23. Интензитет протеинске експресије виментина у HCT-116 ћелијама добијен квантификацијом флуоресценце на микрографијама употребом ImageJ програмског пакета.	90
Графикон 24. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на α -SMA протеински маркер инвазивности у SW-480 ћелијама.	90
Графикон 25. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на α -SMA протеински маркер инвазивности у HCT-116 ћелијама.	91
Графикон 26. Генска експресија маркера EMT-а у SW-480 ћелијама након третмана MM-ом.	92
Графикон 27. Генска експресија маркера EMT-а у SW-480 ћелијама након третмана киселином 10H2DA.	93
Графикон 28. Генска експресија маркера миграције HCT-116 ћелија након третмана MM-ом.	93
Графикон 29. Генска експресија маркера миграције HCT-116 ћелија након третмана киселином 10H2DA.	94
Графикон 30. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на NANOG протеински маркер матичности у SW-480 ћелијама.	95
Графикон 31. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на NANOG протеински маркер матичности у HCT-116 ћелијама.	96
Графикон 32. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на ALDH1B1 протеински маркер матичности у SW-480 ћелијама.	97
Графикон 33. Ефекти третмана на проценат ћелијске популације позитивне на ALDH1B1 протеински маркер матичности у HCT-116 ћелијама.	98
Графикон 34. Фенотипски профил нетретиране ћелијске популације изоловане из ткива почетног и напредног стадијума CRC-а.	101
Графикон 35. Релативна генска експресија маркера EMT-а у нетретираној ћелијској популацији изолованој из ткива почетног и напредног стадијума CRC-а.	102
Графикон 36. Релативна генска експресија маркера матичности у нетретираној ћелијској популацији изолованој из ткива почетног и напредног стадијума CRC-а.	102
Графикон 37. Фенотипски профил ћелијске популације изоловане из ткива почетног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μ M, у односу на контролу.	103
Графикон 38. Релативна генска експресија маркера EMT-а у ћелијској популацији изолованој из ткива почетног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μ M.	104
Графикон 39. Релативна генска експресија маркера матичности у ћелијској популацији изолованој из ткива почетног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μ M.	104

Графикон 40. Фенотипски профил ћелијске популације изоловане из ткива напредног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM , у односу на контролу.....	105
Графикон 41. Релативна генска експресија маркера EMT-а у ћелијској популацији изолованој из ткива напредног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM	106
Графикон 42. Релативна генска експресија маркера матичности у ћелијској популацији изолованој из ткива напредног стадијума CRC-а у третману киселином 10H2DA у концентрацијама 10 и 100 μM	106
Графикон 43. Проценат популације ћелија са најагресивнијим фенотипом у нетретираним (контролним) узорцима колоректалног карцинома почетних и напредних стадијума и узорцима ових стадијума третираних киселином 10H2DA.	107
Графикон 44. Проценат популације ћелија са најагресивнијим фенотипом у нетретираним (контролним) узорцима колоректалног карцинома напредног стадијума и узорцима ових стадијума третираних киселином 10H2DA.....	108

Списак табела

Табела 1. TNM класификација тумора дебелог црева према AJCC (модификовано према: Shia и сар., 2012).....	3
Табела 2. Секвенце прајмера циљаних гена маркера EMT-а (енгл. <i>Forward</i> и <i>reverse</i>)	59
Табела 3. Секвенце прајмера циљаних гена маркера EMT-а и матичности (енгл. <i>Forward</i> и <i>reverse</i>).....	61
Табела 4. Цитотоксичност - IC ₅₀ вредности третмана MM (µg/mL) и 10H2DA (µM) на MRC-5, SW-480 и HCT-116 ћелијским линијама.....	65
Табела 5. Клиничко-патолошке карактеристике пацијената оболелих од колоректалног карцинома.....	99
Табела 6. Процентуална заступљеност 10H2DA у узорцима MM-а широм света.....	119

Royal Jelly and *trans*-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid Inhibit Migration and Invasion of Colorectal Carcinoma Cells

Milena M. Jovanović^{1*},
Dragana S. Šeklić²,
Jelena D. Rakobradović³,
Nevena S. Planojević¹,
Nenad L. Vuković⁴,
Milena D. Vukić⁴ and
Snežana D. Marković¹

¹Department of Biology and Ecology,
Faculty of Science, University of
Kragujevac, Radoja Domanovića 12,
34000 Kragujevac, Serbia

²Institute for Information
Technologies, Department of Natural
Sciences, University of Kragujevac,
Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac,
Serbia

³Institute for Oncology and Radiology
of Serbia, Pasterova 14, 11000
Belgrade, Serbia

⁴Department for Chemistry, Faculty
of Science, University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, 34000
Kragujevac, Serbia

Received: 6 September 2021

Accepted: 12 January 2022



SUMMARY

Research background. Acquisition of migratory potential is pivotal for cancer cells, enabling invasion and metastasis of colorectal carcinoma. Royal jelly and its bioactive component *trans*-10-hydroxy-2-decenoic acid (10H2DA) showed remarkable antimetastatic potential, but the molecular mechanism underlying this activity is unclear.

Experimental approach. Identification and quantification of 10H2DA in royal jelly originating from Serbia was done by HPLC method. Cytotoxicity of 10H2DA was measured by tetrazolium dye MTT test in concentration range 1–500 µg/mL after 24 and 72 h. Its effect on the collective and single-cell migration was measured by wound healing and transwell migration assays. Invasive potential of cancer cells was evaluated by a transwell method modified with collagen. Immunofluorescence was used for migratory and invasive protein expression, while the gene expression of these markers was evaluated by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). All assays were applied on human colorectal carcinoma HCT-116 and SW-480 cell lines and, except for MTT, evaluated after 24 h of treatment with two selected concentrations of royal jelly and 10H2DA.

Results and conclusions. According to HPLC, the mass fraction of 10H2DA in royal jelly was 0.92 % (*m/m*). Treatment with 10H2DA showed no cytotoxic effect; however, significant inhibitory potential of royal jelly and 10H2DA on the motility and invasiveness of colorectal cancer cells was observed. More pronounced effect was exerted by 10H2DA, which significantly suppressed collective cell migration and invasiveness of SW-480 cells, as well as single- and collective cell migration and invasive potential of HCT-116 cell line. Treatments increased epithelial markers E-cadherin and cytoplasmic β-catenin in HCT-116 cells, thus stabilizing intercellular connections. In SW-480 cells, 10H2DA increased E-cadherin on protein and gene level, and suppressed epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers. In both cell lines, treatments induced significant suppression of promigratory/proinvasive markers: N-cadherin, vimentin and Snail on protein and gene level, which explains decreased migratory and invasive potential of HCT-116 and SW-480 cells.

Novelty and scientific contribution. Our study presents new findings and elucidation of royal jelly and 10H2DA molecular mechanism that underlies their antimigratory/antiinvasive activity on colorectal cancer cells. These findings are shown for the first time indicating that these natural products are a valuable source of anticancer potential and should be reconsidered for further antitumour therapy.

Keywords: colorectal cancer; epithelial-mesenchymal transition (EMT); dietary supplement; migration of carcinoma cells; Snail; *trans*-10-hydroxy-2-decenoic acid

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer, responsible for numerous deaths worldwide (1). Metastasis in malignant tumours causes a lethal outcome and newly diagnosed cases are usually at advanced stages, with metastases already present in the body (2).

Motility is an essential property of cancer cells; their dissemination implies migration/invasion through extracellular matrix and is of particular interest for cancer research (3).

*Corresponding author:

Phone: +38134336223

E-mail: milena.jovanovic@pmfkg.ac.rs

БИОГРАФИЈА

Милена М. Јовановић је рођена 28.05.1985. године у Крагујевцу. Основну школу „Мирко Јовановић“ је завршила 2000. године у Крагујевцу, а Другу крагујевачку гимназију је завршила 2004. године у Крагујевцу. На Природно-математичком факултету у Крагујевцу је Основне академске студије Биологије завршила 2015. године са просечном оценом 8,92. Школске 2015/2016 је уписала Мастер академске студије Биологије које је завршила 2016. године са просечном оценом 9,88 и стекла стручни назив Мастер биолог. Године 2016/2017. је уписала Докторске академске студије Биологије на смеру Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија. Милена М. Јовановић је 2017. године изабрана у звање истраживач приправник, и од 2016. године се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Ангажована је на пројекту „Преклиничка испитивања биоактивних супстани (ПИБАС)“ (ев. бр. ИИИ41010), који је финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја, од децембра 2018. године на позицији стручно-техничког сарадника, а од децембра 2019. године као истраживач-приправник. Звање истраживач сарадник је стекла 2020. године и активно се бави научно-истраживачким радом у области ћелијске и молекуларне биологије, са фокусом на испитивања утицаја различитих природних производа и хемијских једињења на миграторни и инвазивни потенцијал карциномских ћелија.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**„Молекуларни механизми миграције и инвазије имортализованих и примарних
ћелијских линија колоректалног карцинома у третману матичним млечом и
активном супстанцом 10H2DA“**

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, 8.12.2023. године,



потпис аутора

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

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

**„Молекуларни механизми миграције и инвазије имортализованих и примарних
ћелијских линија колоректалног карцинома у третману матичним млечом и
активном супстанцом 10H2DA“**

истоветне.

У Крагујевцу, 8.12.2023. године,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Uibena J.', is written over a horizontal line.

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милена М. Јовановић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

„Молекуларни механизми миграције и инвазије имортализованих и примарних хелијских линија колоректалног карцинома у третману матичним млечом и активном супстанцом 10H2DA“

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

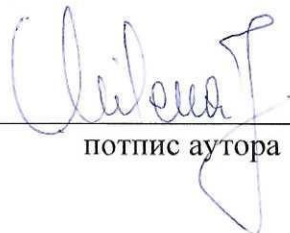
☐ не дозвољавам¹

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

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, 8.12.2023. године,



потпис аутора

јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

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/>