

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Ана Д. Обрадовић

**МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ  
АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ  
НОВОСИНТЕТИСАНИХ  
3-СУПСТИТУИСАНИХ-5-ИЗОПРОПИЛ-  
5-ФЕНИЛХИДАНТОИНА**

докторска дисертација

Београд, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana D. Obradović

**MOLECULAR MECHANISM OF ANTITUMOR  
ACTIVITY OF NEWLY SYNTHESIZED  
3-SUBSTITUTED-5-ISOPROPYL-  
5-PHENILHYDANTOIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Докторска дисертација под називом:

**“МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ  
НОВОСИНТЕТИСАНИХ 3-СУПСТИТУИСАНИХ-5-ИЗОПРОПИЛ-5  
ФЕНИЛХИДАНТОИНА”**

Одбрањена је дана .....на Биолошком факултету у Београду пред комисијом

Др Биљана Божић Недељковић,  
редовни професор,  
Биолошки факултет,  
Универзитет у Београду

Др Бранка Огњановић,  
редовни професор,  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Крагујевцу

Др Милош Матић,  
доцент  
Природно-математички факултет,  
Универзитет у Крагујевцу

Др Бојан Божић,  
виши научни сарадник  
Биолошки факултет,  
Универзитет у Београду

Др Емилија Маринковић  
научни сарадник  
Институт за вирусологију,  
вакцине и серуме „Торлак“

Кандидат Ана Обрадовић постигла је оцену.....на одбрани Докторске дисертације.

## *ЗАХВАЛНИЦА*

*Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторијама Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Института за физиологију и биохемију „Иван Ђаја“ Биолошког факултета и Института за вирусологију, вакцине и серуме „Порлак“, Универзитета у Београду.*

*Овом приликом се најтоплије захваљујем свом ментору проф. др Биљани Божић Недељковић на безрезервној помоћи коју ми је пружила током свих фаза израде ове дисертације и која ме је увела у свет имунологије.*

*Велику захвалност дугујем проф. др Бранки Огњановић на стручним саветима, великој подршци и корисним сугестијама који су допринели да овај рад добије на квалитету и садржајности.*

*Посебну захвалност дугујем доц. др Милошу Матићу за све знање, вештине и умеће, које ми је пренео, за разумевање, пријатељске савете и несебичну помоћ да истрајем током израде ове докторске дисертације.*

*Захваљујем се др Бојану Божић за корисне сугестије и савете који су допринели квалитету ове дисертације.*

*Захваљујем се др Емилији Маринковић на корисним сугестијама и саветима током израде овог рада.*

*Пријатељима велико хвала на подршци.*

*Мами и тати велико хвала на љубави, стрпљењу и разумевању!*

*У Београду  
2020*

*Ана Д Обрадовић*



## САДРЖАЈ

<b>1. Увод</b> .....	1
1.1. Настанак тумора .....	2
1.2. Тумор дебелог црева .....	3
1.3. Тумор дојке .....	5
1.4. Имунски одговор против тумора .....	6
1.5. Ћелијски циклус и апоптоза .....	10
1.6. Регулација инфламације .....	16
1.6.1. Улога циклооксигеназа у регулацији процеса апоптозе .....	18
1.7. Инвазија и метастаза .....	21
1.7.1. Принципи ћелијске покретљивости .....	21
1.8. Оксидативни и антиоксидативни метаболизам .....	22
1.8.1. Улога реактивних молекула у туморогенези .....	22
1.8.2. Реактивне врсте кисеоника .....	24
1.8.3. Реактивне врсте азота .....	26
1.8.4. Систем заштите од оксидативних оштећења .....	27
1.8.4.1. Глутатион - главна неензимска компонента система антиоксидативне заштите .....	27
1.9. Хидантоини .....	29
1.9.1. Физичке особине хидантоина .....	29
1.9.2. Физиолошки активни деривати хидантоина и веза између њихове структуре и биолошке активности .....	30
<b>2. Циљеви истраживања</b> .....	32
<b>3. Материјал и методе истраживања</b> .....	35
3.1. Хемикалије и реагенси .....	36
3.2. Ћелијско-молекуларне анализе .....	36
3.2.1. Ћелијске линије .....	36
3.2.2. Експериментални дизајн .....	38
3.3. Поступак пасажирања ћелија .....	39
3.4. Поступак одређивања броја вијабилних ћелија .....	39
3.5. Испитивање цитотоксичности и ефеката на процес апоптозе .....	40
3.5.1. МТТ тест вијабилности ћелија .....	40
3.5.2. Мерење активности лактат дехидрогеназе .....	40
3.5.3. Испитивање типа ћелијске смрти проточном цитометријом Annexin V/7-AAD бојењем .....	41
3.5.4. Детекција активности каспаза проточном цитофлуориметријом .....	41
3.5.5. Анализа ћелијског циклуса проточном цитофлуориметријом .....	41
3.6. Испитивање параметара редокс статуса .....	42
3.6.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала .....	42
3.6.2. Одређивање концентрације нитрита .....	42
3.6.3. Одређивање концентрације тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона .....	42
3.7. Миграциони ћелијски есеј 2D (Boyden chamber) .....	43
3.8. Испитивање генске експресије гена за <i>iNOS</i> , <i>COX-2</i> и <i>MMP-9</i> .....	43
3.8.1. Изоловање РНК из ћелија .....	43
3.8.2. Реверзна транскрипција информационе РНК (RT PCR) .....	44
3.8.3. Квантитативни PCR (qPCR) .....	44
3.9. Испитивање улоге и активности сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање ћелија применом имуноблота .....	44
3.10. Статистичка обрада резултата .....	45
<b>4. Резултати</b> .....	46
4.1. Биокompatibilност .....	47
4.2. Молекуларни механизми антитуморске активности испитиваних деривата хидантоина .....	48
4.2.1. Антипролиферативни ефекат деривата хидантоина према HCT-116 ћелијској линији .....	48
4.2.2. Антипролиферативни ефекат деривата хидантоина према MDA-MB-231 ћелијској линији .....	50
4.3. Утицај испитиваних деривата хидантоина на активност лактат дехидрогеназе показатеља цитотоксичности .....	52
4.3.1. Утицај испитиваних деривата хидантоина на активност лактат дехидрогеназе након третмана HCT-116 ћелија .....	52

4.3.2. Утицај испитиваних деривата хидантоина на активност лактат дехидрогеназе након третмана MDA-MB-231 ћелија .....	53
4.4. Утицај испитиваних деривата хидантоина на индукцију апоптозе и застој у ћелијском циклусу .....	54
4.4.1. Утицај деривата хидантоина на индукцију апоптозе HCT-116 ћелија .....	54
4.4.2. Утицај деривата хидантоина на индукцију апоптозе MDA-MB-231 ћелија .....	56
4.4.3. Утицај деривата хидантоина на ћелијски циклус .....	57
4.4.3.1. Утицај деривата хидантоина на ћелијски циклус HCT-116 ћелија .....	57
4.4.3.2. Утицај деривата хидантоина на ћелијски циклус MDA-MB-231 ћелија .....	58
4.4.4. Ефекти деривата хидантоина на активацију каспаза .....	59
4.4.4.1. Ефекти деривата хидантоина на активацију каспаза у HCT-116 ћелијама .....	60
4.4.4.2. Ефекти деривата хидантоина на активацију каспаза у MDA-MB-231 ћелијама .....	60
4.5. Утицај испитиваних деривата хидантоина на продукцију реактивних врста кисеоника и азота од стране туморских ћелија .....	61
4.5.1. Продукција супероксид анјон радикала од стране HCT-116 ћелија третираних дериватима хидантоина .....	62
4.5.2. Продукција супероксид анјон радикала од стране MDA-MB-231 ћелија третираних дериватима хидантоина .....	63
4.5.3. Продукција азот оксида од стране HCT-116 ћелија третираних дериватима хидантоина .....	64
4.5.4. Продукција азот оксида од стране MDA-MB-231 ћелија третираних дериватима хидантоина .....	65
4.6. Утицај испитиваних деривата хидантоина на ниво тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона продукованог од стране туморских ћелија .....	66
4.6.1. Ниво тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона у HCT-116 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	66
4.6.2. Ниво тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	68
4.7. Утицај испитиваних деривата хидантоина на миграторни потенцијал туморских ћелија .....	71
4.7.1. Миграторни потенцијал HCT-116 ћелија третираних одабраним дериватима хидантоина .....	71
4.7.2. Миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија третираних одабраним дериватима хидантоина .....	72
4.8. Утицај одабраних деривата хидантоина на експресију гена од значаја за туморогенезу .....	73
4.8.1. Експресија <i>iNOS</i> гена у HCT-116 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	74
4.8.2. Експресија <i>iNOS</i> гена у MDA-MB-231 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	74
4.8.3. Експресија <i>COX-2</i> гена у HCT-116 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	75
4.8.4. Експресија <i>COX-2</i> гена у MDA MB-231 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	76
4.8.5. Експресија <i>MMP-9</i> гена у HCT-116 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	76
4.8.6. Експресија <i>MMP-9</i> гена у MDA MB-231 ћелијама третираним дериватима хидантоина .....	77
4.9. Улога и активност сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање ћелија .....	78
4.9.1. Активност сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање HCT-116 ћелија .....	78
4.9.2. Активност сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање MDA MB-231 ћелија .....	79
<b>5. Дискусија</b> .....	82
<b>6. Закључци</b> .....	98
<b>7. Литература</b> .....	102

## Списак слика, табела и графика

**Слика 1.** Општи преглед неправилности хроматинске хомеостазе током неопластичне трансформације здраве ћелије

**Слика 2.** Урођени имунски одговор на оштећење и неопластичне трансформације и последично оштећење ткива

**Слика 3.** Деловање имуносупресорских сигнала туморског ткива на здраво ткиво у окружењу

**Слика 4.** Циклус имунског одговора на тумор

**Слика 5.** А – Реакције ћелија имунског система на туморско ткиво; Б – Развој имуносупресије у туморском окружењу

**Слика 6.** Схематски приказ спољашњег и унутрашњег пута апоптозе

**Слика 7.** Механизми избегавања апоптозе код туморских ћелија током туморогенезе

**Слика 8.** Сигнална каскада покренута активацијом EGFR који стимулише COX-2 транскрипцију у туморским ћелијама

**Слика 9.** MAPK сигнални пут

**Слика 10.** Механизам деловања хипоксије у туморском ткиву

**Слика 11.** Респираторни електрон-транспортни ланац и стварање ROS и RNS у митохондријама

**Слика 12.** Структура NOS изоформи

**Слика 13.** Продукција реактивних молекула и механизми антиоксидативне заштите у ћелији

**Слика 14.** Структура хидантоина

**Слика 15.** Синтеза 5-изопропил-5-фенилхидантоина

**Слика 16.** Синтеза 3-(4-супституисани бензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоина

**Слика 17.** Морфолошки изглед HCT-116 ћелија под фазно-контрастним микроскопом

**Слика 18.** Морфолошки изглед MDA-MB-231 ћелија под фазно-контрастним микроскопом

**Слика 19.** Морфолошки изглед MRC-5 ћелија под фазно-контрастним микроскопом

**Слика 20.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активациони статус ERK1/2 сигналног пута у HCT-116 ћелијама

**Слика 21.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активациони статус ERK1/2 сигналног пута у MDA-MB-231 ћелијама

**Слика 22.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активациони статус JNK сигналног пута у MDA-MB-231 ћелијама

**Табела 1.** Секвенце парова прајмера коришћене у експресији гена

**Табела 2.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на вијабилност MRC-5 ћелија

**Табела 3.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на вијабилност HCT-116 ћелија

**Табела 4.** IC<sub>50</sub> вредности испитиваних деривата хидантоина добијене након третмана HCT-116 ћелија у различитим временским периодима

**Табела 5.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на вијабилност MDA-MB-231 ћелија

**Табела 6.** IC<sub>50</sub> вредности испитиваних деривата хидантоина добијене након третмана MDA-MB-231 ћелија у различитим временским периодима

**Табела 7.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) од стране HCT-116 ћелија.

**Табела 8.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) од стране MDA MB-231 ћелија

**Табела 9.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију азот оксида од стране HCT-116 ћелија

**Табела 10.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију азот оксида од стране MDA MB-231 ћелија

**Табела 11.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво тоталног глутатиона у HCT-116 ћелијама.

**Табела 12.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво редукованог глутатиона у HCT-116 ћелијама.

**Табела 13.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво оксидованог глутатиона у HCT-116 ћелијама

**Табела 14.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво тоталног глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама

**Табела 15.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво редукованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама

**Табела 16.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво оксидованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама

**График 1.** Процена цитотоксичног ефекат одабраних деривата хидантоина на HCT-116 ћелијама одређена LDH тестом.

**График 2.** Процена цитотоксичног ефекта одабраних деривата хидантоина на MDA-MB-231 ћелијама одређена LDH тестом.

**График 3.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на диструбицију HCT-116 ћелија у различитим фазама апоптозе и у некрози

**График 4.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на диструбицију MDA-MB-231 ћелија у различитим фазама апоптозе и у некрози

**График 5.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на промене у ћелијском циклусу HCT-116 ћелија

**График 6.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на промене у ћелијском циклусу MDA-MB-231 ћелија.

**График 7.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активност каспаза у HCT-116 ћелијама

**График 8.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активност каспаза у MDA-MB-231 ћелијама

**График 9.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на миграторни капацитет HCT-116 ћелија

**График 10.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на миграторни капацитет MDA-MB-231 ћелија

**График 11.** Релативни ниво експресије иРНК за iNOS након третмана HCT-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата

**График 12.** Релативни ниво експресије иРНК за iNOS након третмана MDA-MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата

**График 13.** Релативни ниво експресије иРНК за COX-2 након третмана HCT-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата

**График 14.** Релативни ниво експресије иРНК за COX-2 након третмана MDA MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата

**График 15.** Релативни ниво експресије иРНК за MMP-9 након третмана HCT-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата

**График 16.** Релативни ниво експресије иРНК за MMP-9 након третмана MDA MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата

## СКРАЋЕНИЦЕ

15-PGDH – 15-простагландин дехидрогеназа

7-AAD (енгл. *7-Aminoactinomycin D*) – 7-аминоактиномицин D

Annexin-V-FITC (енгл. *Annexin-V-Fluoroscein Isothiocyanate*) – анексин-V-флуоресцеин-изотиоцијанат

AOS (енгл. *Antioxidative Defense System*) – антиоксидативни заштитни систем

AP-1 (енгл. *Activator protein 1*) – активациони протеин 1

APCs (енгл. *Antigen presenting cells*) – антиген-презентујуће ћелије

ARE (енгл. *Antioxidant Response Element*) – везујући протеин

ATCC (енгл. *American Type Culture Collection*)

АТР (енгл. *Adenosine*) – аденозин трифосфат

ВН4 (енгл. *Tetrahydrobiopterin*) – тетрахидробиоптерин

BRCA1 (енгл. *Breast Cancer 1*) – ген повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома дојке

BRCA2 (енгл. *Breast Cancer 2*) – ген повезан са повећаним ризиком за настанак карцинома дојке

САТ (енгл. *Catalase*) – каталаза

CCl<sub>3</sub>• – трихлорметил радикал

Cdk (енгл. *Cyclin-dependent kinase*) – циклин-зависна киназа

COX (енгл. *Cyclooxygenase*) - циклооксигеназа

COX 1 (енгл. *Cyclooxygenase 1*) – циклооксигеназа 1

COX 2 (енгл. *Cyclooxygenase 2*) – циклооксигеназа 2

CTLs (енгл. *Cytotoxic T lymphocytes*) – цитотоксични Т лимфоцити

EDAR (енгл. *Ectodysplasin A receptor*) – ектодисплазин А рецептор

EGF (енгл. *Epidermal Growth Factor*) - епидермални фактор раста

EGFR (енгл. *Endothelial Growth Factor Receptor*) – рецептор епидермалног фактора раста

eNOS (енгл. *Inducible Nitric Oxide Synthase*) - ендотелна азот оксид синтаза

ERK1/ ERK2 (енгл. *Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*) – екстрацелуларним сигналом регулисана киназа 1 и 2

ER (енгл. *Endoplasmatic Reticulum*) - ендоплазматични ретикулум

FACL4 (енгл. *Fatty Acid CoA Ligase 4*) – масно-киселинска CoA лигаза

FGF-2 (енгл. *Fibroblast Growth Factor-2*) - фактор раста фибробласта

GR – глутатион-редуктаза  
GSH – глутатион  
GSH-Px – глутатион-пероксидаза  
GSSG – оксидовани глутатион  
GST – глутатион-S-трансфераза  
HA (енгл. *Hyaluronic Acid*) - хијалуронска киселина  
IL-10 – интерлеукин 10  
iNOS (енгл. *Inducible Nitric Oxide Synthase*) – индуцибилна азот оксид синтетаза  
INT – (енгл. *2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride*) – 2-(4-јодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенил-2H-тетразолијум хлорид  
iRNA - информациона РНК  
L• – липидни радикал  
LOX – липооксигеназа  
MAPK (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*) - митогеном активирани протеин киназе  
MDA – малондиалдехид  
MDSC (енгл. *Myeloid Derived Suppressor Cells*) - имуносупресорске мијелоидне ћелије  
MHC (енгл. *Major Histocompatibility Complex*) – главни комплекс ткивне подударности  
MMP (енгл. *Matrix Metaloproteinase*)- матриксне металопроотеиназе  
MMP-9 – матриксна металопроотеиназа 9  
MPF (енгл. *Maturation-Promoting Factor*) – фактор који подстиче сазревање  
NAD – никотинамид аденин динуклеотид  
NAD(P)H – никотинамид аденин динуклеотид фосфат, редуковани  
NFAT – нуклеарни фактор активираних Т ћелија  
NF-κB (енгл. *Nuclear Factor Kappa B*) – нуклеарни фактор κB  
NGFR (енгл. *Nerve Growth Factor Receptor*) – рецептор за неурални фактор раста  
nNOS (енгл. *Neuronal Nitric Oxide Synthase*) – неуронална азот оксид синтетаза  
NO (енгл. *Nitric Oxide*) – азот оксид  
NOS (енгл. *Nitric Oxide Synthase*) – азот оксид синтаза  
NSAID (енгл. *Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs*) – нестероидни антиинфламаторни лекови  
O<sub>2</sub><sup>•</sup> – супероксид анион радикал  
ONOO<sup>-</sup> – пероксинитрит  
PEA3 (енгл. *Polyoma Enhancer Activator 3*)  
PG (енгл. Prostaglandins) - простагландин  
PGE<sub>2</sub> (енгл. Prostaglandin E<sub>2</sub>) - простагландин E<sub>2</sub>  
PKC – протеин-киназа C

PMN (енгл. *Polymorphonuclear Neutrophils*) - неутрофили

PMS – (енгл. *N-methylphenazonium methyl sulfate*) – N-метилфеназонијум метилсулфат

PTGS1 – простагландин 1

PTGS2 – простагландин 2

PUFA (енгл. *Polyunsaturated Fatty Acids*) – полинезасићене масне киселине

RNS (енгл. *Reactive Nitrogen Species*) – реактивне врсте азота

ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*) – реактивне врсте кисеоника

SOD (енгл. *Superoxide dismutase*) – супероксид-дисмутаза

TAM (енгл. *Tumor-Associated Macrophages*) - макрофаги

Tcf4 – T-ћелијски лимфоидни транскрипциони фактор

TGF- $\beta$  (енгл. *Transforming Growth Factor beta*) – трансформишући фактор раста бета

TNF (енгл. *Tumor Necrosis Factor Receptor*) рецептори

Th (енгл. *T helper*) – помоћничке T-ћелије

TIA-1 (енгл. *T-cell Intracellular Antigen-1*) – везујући протеин

TLR (енгл. *Toll like receptor*) – рецептори слични Toll-у

TNF (енгл. *Tumor Necrosis Factor*) – фактор некрозе тумора

Treg (енгл. *Regulatory T cells*) - регулаторни T лимфоцити

TRAIL-1 (енгл. *TNF-related apoptosis inducing ligand 1*) – TNF-сродни апоптоза-индукујући лиганд 1

VEGF (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*) – васкуларни ендотелни фактор раста

ЕЦМ – екстрацелуларни матрикс

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид

HO<sub>2</sub><sup>•</sup> – хидропероксил радикал

OH<sup>•</sup> – хидроксил радикал

РНК – рибонуклеинска киселина



# МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ 3-СУПСТИТУИСАНИХ-5-ИЗОПРОПИЛ-5 ФЕНИЛХИДАНТОИНА

## РЕЗИМЕ

Колоректални тумор је један од три најчешћа типа тумора у западној хемисфери и представља водећи узрок смрти изазван тумором у целини. До 20% пацијената има метастатску дисеминацију, најчешће у јетри. Операција би могла бити ефикасан третман само за одабране пацијенте, док су зрачење и помоћна хемотерапија и даље доминантна препоручена терапија за пацијенте са колоректалним тумором који имају метастазе на лимфним чворовима.

Тумор дојке је најчешћи тип тумора и други водећи узрок смрти повезаних са тумором код жена широм света, што резултира са више од пола милиона смрти сваке године. Упркос широкој употреби мултимодалних хемотерапија, ниво смртности остаје висок, што наглашава потребу за новим терапијским приступима са већом ефикасношћу против малигних ћелија и напредном селективношћу према здравим ткивима.

Хидантоин (имидазолидин-2,4-дион) и његови бројни деривати су једињења која се користе за клиничко лечење напада, епилепсије и срчане аритмије. Различита биолошка и фармаколошка својства, деривата хидантоина омогућила су им додатну примену као антимикуробна, фунгицидна и хербицидна средства, такође испољавајући значајна противупална, хиполипидемична, антихипертензивна и анти туморска дејства. Нове физиолошке улоге хидантоина и његових деривата описане су у бројним истраживањима и данас су предмет многих студија. Хидантоин и његови новосинтетисани деривати су у фокусу нових студија због бројних биолошких активности и новонасталих корисних ефеката у различитим патолошким стањима, укључујући тумор.

Циљ ове студије био је проценити могуће анти туморске механизме низа синтетисаних деривата **3-(4-супституисаних бензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоина** на различитим аспектима ћелијске физиологије код ћелијских линија тумора дебелог црева, НСТ-116 и тумора дојке, MDA-MB-231. Ћелије су третиране растућим концентрацијама деривата хидантоина (0,01  $\mu$ M до 100  $\mu$ M) током 24, 48 и 72 сата, након чега је извршена процена степена пролиферације, присуства апоптозе, анализа ћелијског циклуса, активности каспаза, оксидативног/анти-оксидативног статуса, производње нитрита и способности миграције/потенцијал инвазије, утврђен је и профил експресије гена за iNOS, COX-2 и MMP-9. Добијени резултати показују значајан анти туморски потенцијал испитиваних деривата, посебно **3-бензил-5-изопропил-5-фенилхидантоина** и **3-(4-хлоробензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоина**, што указује на могућност њихове потенцијалне употребе за развоју ефикаснијих хемотерапијских агенаса.

Апоптоза игра кључну улогу у развоју организма, хомеостази ткива, имунском одговору, као и у етиологији бројних болести, укључујући туморе. Туморске ћелије избегавају апоптозу, прекомерно се размножавају и опстају у хипоксичним условима, стекавши отпорност на терапијска средства. Међу разним механизмима који доприносе избегавању апоптозе у ћелијама тумора појављују се њихове специфичне метаболичке адаптације и сигнализација као пресудни фактори. Ћелијски метаболити и разни сигнални молекули могу да регулишу активацију про- и анти-апоптотских протеина, укључујући каспазе, породицу протеаза специфичних за аспарагинску киселину, које су главни ефектори апоптозе. Каспазе

се обично синтетишу као неактивни прекурсори, али активирају се на почетку апоптозе различитим сигнаlima. Очекује се да ће средства која изазивају апоптозу бити ефикасни анти туморски лекови, пошто је апоптоза заштитни механизам против развоја тумора који делује на уклањање генетски оштећених ћелија из епитела пре него што се подвргну клонској експанзији.

Производња реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) је физиолошки процес својствен свим аеробним организмима услед активности респираторног ланца митохондрија. Оксидативни стрес представља губитак равнотеже између производње ових агресивних радикала и процеса њихове неутрализације деловањем компензацијских антиоксидативних механизмима, што може довести до вишеструких ћелијских оштећења и до развоја различитих болести, укључујући тумор. ROS индукују туморогенезу деловањем на нивоу генетских и епигенетских механизма, а повишен ниво ROS откривен у бројним туморима снажно имплицира улогу оштећења ДНК различитим оксидирајућим молекулима у индукцији развоја и раста тумора. Азот оксид (енгл. *Nitric Oxide*, NO) се такође сматра молекулом повезаним са туморима. Улога NO у стварању и расту тумора и даље остаје контроверзна. Овај молекул има важну улогу у различитим фазама туморогенезе, укључујући оштећење ДНК, активацију онкогена, инхибицију ензима за поправљање ДНК и гена за супресоре тумора и модулацију апоптозе и процеса настанка метастаза. Различите улоге NO у апоптози, ћелијском циклусу, прогресији тумора, ангиогенези и настанку метастаза се разматрају, јер је утврђено да је NO изразито повезан са паренхимом тумора, као и са микрооколином тумора. Микро окружење тумора укључује стромалне ћелије, имунске ћелије и ћелије васкуларног ткива, а NO је утврђен као један од кључних продуката њихове активности. Сва тестирана једињења су дозно и временски зависна у третману на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама. Испитивани деривати индуковали су пад нивоа параметара оксидативног стреса и повећање нивоа нитрита у супернатантима третираних ћелијама, што указује на њихове значајне антиоксидативне ефекте. Снажну антипролиферативну активност изразила су сва тестирана једињења и индуковала повећање дозно и временски зависног нивоа нитрита. Недавно је показано да различити деривати хидантоина показују значајно анти туморско деловање на различитим туморима.

Концентрације са оптималним антипролиферативним ефектима (1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ ) су изабране за испитивање ефеката на индукцију апоптозе, ћелијског циклуса, капацитета ћелија за миграцију и инвазију. Након 72-часовног третмана, индекс миграције утврђен је анализом тестом миграције, док је капацитет инвазије испитиван мерењем нивоа експресије гена за азот оксид синтетазу (iNOS), матриксну металопротеиназу (MMP-9) и циклооксигеназу-2 (COX-2). Хемотактичка миграција и инвазија ћелија тумора у околно ткиво је пресудан корак у настанку метастаза тумора па се многи терапијски приступи заснивају на смањењу миграторних/инвазивних капацитета ћелија тумора. Индекс миграције ћелија и ниво експресије MMP-9 гена који подстиче инвазију тумора значајно су смањени након третмана третираним дериватима хидантоина што имплицира њихову инхибиторну улогу у покретљивости ћелија тумора дебелог црева и инвазивним процесима. Ниво iNOS гена за COX-2 смањен је у поређењу са вредностима у нетретираним контролним ћелијама, што указује на значајне анти-инфламаторне/анти туморске ефекте ових једињења. У обе коришћене концентрације сва примењена једињења значајно су смањила вијабилност ћелија, капацитет миграције и ниво експресије гена опд значаја за инвазију тумора. Прекомерна експресија iNOS-а индукује стимулаторне или инхибиторне ефекте на раст тумора, у зависности од микроокурења и врсте тумора. Ефекат NO зависи од нивоа експресије iNOS-а, трајања и времена испоруке NO, садржаја микрооколине, генетске основе и врсте ћелије, али је несумњиво укључен у прогресију тумора.

Ови подаци сугеришу да третирано дериватима хидантоина испољавају знатну анти туморску активност смањујући брзину пролиферације ћелија, подижући ниво апоптозе и

инхибирајући покретљивост и инвазију ћелија тумора дојке. Резултати добијени у овој студији указују на испитивана једињења као молекуле са потенцијално корисном улогом у развоју нових терапијских стратегија против раста и ширења како тумора дебелог црева тако и тумора дојке. Упркос разним новим терапијским приступима, хемотерапија је и даље најчешћи облик лечења тумора дебелог црева и дојке. Главна ограничења овог типа терапије су знатна токсичност најчешће коришћених хемотерапеутика и све већа отпорност ћелија тумора. Испитивани новосинтетисани деривати хидантоина показали су значајно антитуморско деловање на ћелијској линији тумора дебелог црева, НСТ-116 ћелије и ћелијској линији тумора дојке, MDA-MB-231 ћелије, мерено различитим параметрима. Сва тестирана једињења имала су значајне дозно и временски зависне антипролиферативне, проапоптотске и антиоксидативне ефекте према НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама. Ова једињења су индуковала смањење ћелијске миграције и способност инвазије и показала значајну селективност у инхибицији пролиферације између ћелија тумора и немалигних ћелија. На основу наших резултата, нови деривати хидантоина су имали јаче антитуморске ефекте у ћелијама НСТ-116 и MDA-MB-231 у поређењу са примарним једињењем на коме су изведене модификације, сугеришући да замена фенил групе изопропилном групом може да потенцира ефекте инхибиције тумора дебелог црева и дојке, чинећи ове молекуле обећавајућим кандидатима за даља истраживања на *in vivo* експерименталним животињским моделима тумора са циљем развоја ефикаснијих а мање токсичних антитуморских лекова.

# MOLECULAR MECHANISM OF ANTITUMOR ACTIVITY OF NEWLY SYNTHESIZED 3-SUBSTITUTED-5-ISOPROPYL-5-PHENYLHYDANTOIN

## SUMMARY

Colorectal cancer is one of the three most common cancer types in the Western Hemisphere and represents a leading cause of death induced by cancer overall. Up to 20% of patients experience metastatic dissemination, most commonly to the liver. The surgery could be effective treatment only for selected patients, while the radiation and adjuvant chemotherapy remain the dominant recommended therapies for colorectal cancer patients with lymph node metastases.

Breast cancer is the most common cancer type and the second leading cause of cancer-related deaths in women across the world resulting in more than half a million deaths each year. Despite the extensive use of multimodal chemotherapies, the level of mortality remains high, emphasizing the need for novel therapeutic approaches with higher efficiency against malignant cells and advanced selectivity towards healthy tissues.

Hydantoin (imidazolidine-2,4-dione) and its numerous derivatives are compounds widely used for clinical treatment of seizures, epilepsy, and cardiac arrhythmias. Possessing various biological and pharmacological properties, hydantoin derivatives gained additional applications as anti-microbial, fungicidal, and herbicidal agents, also expressing significant anti-inflammatory, hypolipidemic, antihypertensive, and antitumor activities. Novel physiological roles of hydantoin and its derivatives emerged in numerous studies are yet to be fully understood. Hydantoin and its newly synthesized derivatives have recently become a focus of interest due to their numerous biological activities and newly emerging beneficial effects in different pathological conditions, including cancer.

The aim of this study was to evaluate the possible antitumor mechanisms of series of newly synthesized **3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin** derivatives on different aspects of cell physiology of human colon cancer cell line, HCT-116 and human breast cancer cell line MDA-MB-231. The increasing concentrations of derivatives (0.01  $\mu\text{M}$  up to 100  $\mu\text{M}$ ) were applied to cells during 24 h, 48 h, and 72 h after which the evaluation of proliferation, apoptosis, cell cycle oxidative/anti-oxidative status, nitrite production, and migration/invasion potential, iNOS, COX-2 and MMP-9 expression profile of treated cells were performed. The obtained results show significant anti-tumor potential of tested derivatives, especially **3-benzyl-5-isopropyl-5-phenylhydantoin** and **3-(4-chlorobenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin**, suggesting their potential usage in the development of more effective chemotherapies.

Apoptosis plays a crucial role in development of organism, tissue homeostasis, immune response, and in etiology of numerous diseases, including tumors. Tumor cells evade apoptosis, excessively proliferate and survive under hypoxic conditions, acquiring the resistance to therapeutic agents. Among various mechanisms that contribute to the evasion of apoptosis in tumor cells their specific metabolic adaptations and signaling are emerging as the crucial factors. Cellular metabolites and various signal molecules can regulate the activation of pro- and anti-apoptotic proteins including caspases, a family of aspartic acid-specific proteases, which are the major effectors of apoptosis. Caspases are normally synthesized as inactive precursors but become activated at the onset of apoptosis by different activation signals. Apoptosis-inducing agents are expected to be effective antitumor drugs, since apoptosis is a protective mechanism against tumor development that acts to remove genetically damaged cells from the epithelium before they undergo clonal expansion.

The production of reactive oxygen species (ROS) is a physiological process inherent to all aerobic organisms due to mitochondrial respiratory chain activity. Oxidative stress represents an

imbalance between the production of these aggressive radicals and their neutralization by the compensating anti-oxidative mechanisms, which can lead to multiple cellular damages and to development of various diseases, including cancer. ROS induce carcinogenesis by genetic and epigenetic mechanisms and elevated levels of ROS detected in numerous tumors strongly implicate the role of DNA damage by different oxidizing molecules in promoting tumor development and progression. Nitric oxide (NO) has also been considered as tumor-associated molecule. The roles of NO in tumor formation and progression remain controversial. This molecule has an important role in various stages of tumorigenesis such as DNA damage, oncogene activation, inhibition of DNA repair enzymes and tumor suppressor genes, and the modulation of apoptosis and metastasis. The different roles of NO in apoptosis, cell cycle, tumor progression, angiogenesis, and metastasis are currently viewed at host tissue and tumor interface since NO was found to be strikingly associated with tumor parenchyma, as well as, with the tumor microenvironment. The tumor microenvironment includes stromal cells such as cells of the immune system and vascular tissue, and NO was established to be one of the key components of their activity. The investigated derivatives induced decrease in levels of oxidative stress parameters and increase in levels of nitrite production by treated cells suggesting their significant antioxidative effects. All tested compounds expressed the strong antiproliferative activity and induced dose- and time-dependent increase in level of nitrites. Recently, various hydantoin derivatives have been shown to exert significant antitumor activity on different tumors. All tested compounds expressed the dose- and time-dependent anti-proliferative and pro-apoptotic activities against HCT-116 and MDA-MB-231 cells.

The concentrations with optimal antiproliferative effects (1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) were chosen for further investigation of the effects on induction of apoptosis, migration capacity and cell invasion potential. After 72 h treatment the migration index was determined by Boyden chamber transwell migration assay, while the invasion capacity was examined by measuring the level of iNOS, MMP-9 and COX-2 gene expression. Chemotactic migration and invasion of cancer cells into surrounding tissue is a crucial step in tumor metastasis and many therapeutic approaches are based on a reduction of migration/invasion capacity of cancer cells. The cell migration index and expression level of tumor invasion-promoting metalloproteinase-9 (MMP-9) gene were significantly decreased after treatment with the tested hydantoin derivatives implicating their inhibitory role in colon cancer cell motility and invasion processes. The mRNA level of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene as a pro-inflammatory gene related to colorectal carcinogenesis was reduced compared to values in the non-treated control cells indicating the significant anti-inflammatory/anti-tumor effects of these compounds. In both used concentrations all applied compounds significantly decreased cell survival, migration capacity and the expression levels of invasion genes. iNOS overexpression induce stimulative or inhibitory effects on tumor growth, depending on the microenvironment and tumor type. Overall, the effect of NO depends on the expression level of iNOS, duration and timing of NO delivery, contents of microenvironment, genetic background, and type of cell, but undoubtedly is involved in tumor progression.

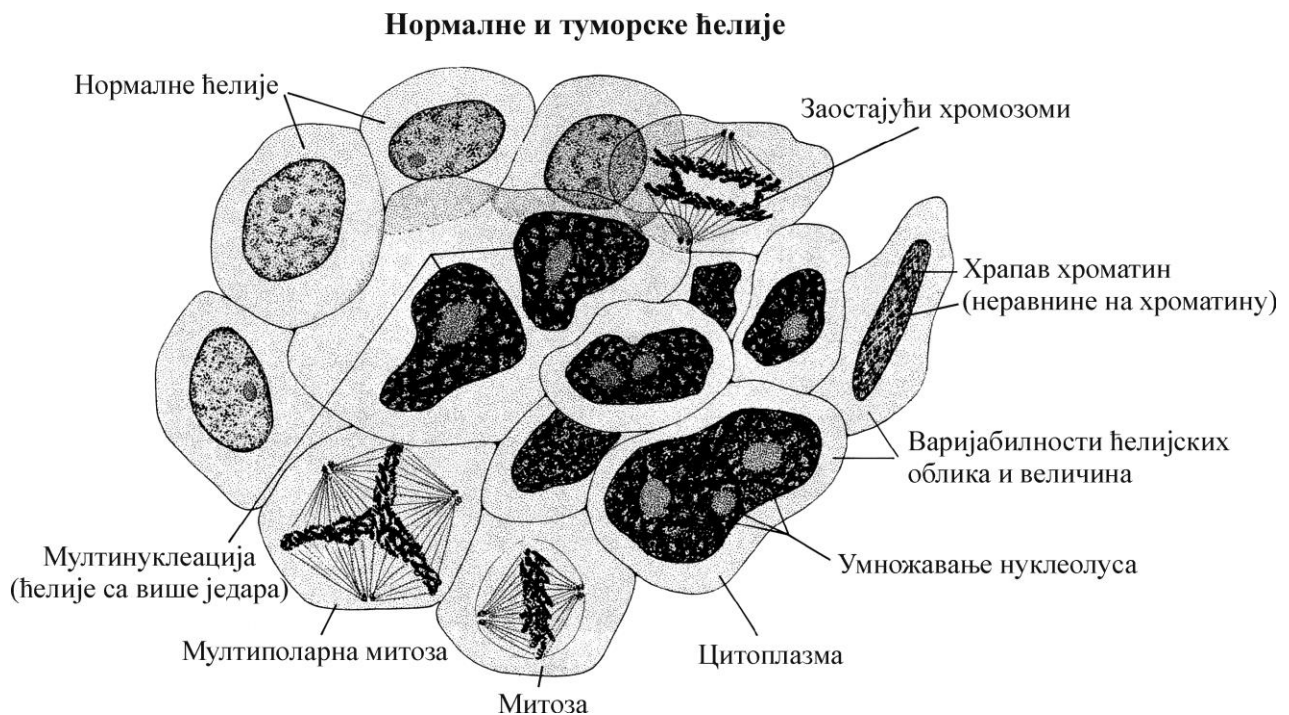
These data suggest that the tested hydantoin derivatives express considerable antitumor activity by reducing cell division rate, elevating apoptosis level and inhibiting the motility and invasion of breast cancer cells. The results obtained in our study indicate these compounds as molecules with potential beneficial role in the development of new therapeutic strategies against breast cancer growth and progression. Despite various new therapeutic approaches, chemotherapy remains the most common form of colon and breast cancer treatment. Its main limitations are the considerable toxicity of commonly used chemotherapeutics and increasing resistance of cancer cells. The investigated newly synthesized hydantoin derivatives have shown significant antitumor activity against colon cancer cells line, HCT-116 cells and human breast cancer cell line, MDA-MB-231 cells measured by different parameters. All tested compounds exerted significant antiproliferative, proapoptotic, and antioxidative effects against HCT-116 and MDA-MB-231 in the dose- and time-dependent manners as one of the most important antitumor mechanisms. These compounds have

provoked the reduction of cell migration and invasion capacity and exhibited significant selectivity in the inhibition of proliferation between cancer cells and non-malignant cells. Based on our results the novel hydantoin derivatives exerted stronger antitumor effects in human HCT-116 and MDA-MB-231 cells compared to compound **0 (3-benzyl-5,5-diphenylhydantoin)** from previous study, suggesting that replacement of phenyl group with isopropyl group could potentiate the colon cancer-inhibiting effects, making these molecules a promising candidate for further researches in *in vivo* animal models with the aim of developing more efficient antitumor drugs.

# **1. Увод**

## 1.1. Настанак тумора

У основи патогенезе широког спектра поремећаја, од неуродегенеративних обољења до малигнух тумора, је одступање у регулацији ћелијског циклуса. Хомеостаза у ткивима се постиже одржавањем динамичке равнотеже између строго контролисаних процеса ћелијске деобе и програмиране ћелијске смрти чиме се обезбеђује регенерација функционалних ћелија и елиминација оштећених и/или остарелих ћелија. У стањима у којима постоји поремећај ћелијског циклуса, ткиво може да уђе у процес одумирања уколико се фаворизује померање равнотеже према про-апоптотским процесима или да крене у правцу неопластичних трансформација уколико дође до дисбаланса хомеостазе у правцу неконтролисаног умножавања ћелија и/или инхибиције процеса ћелијске смрти по типу апоптозе (Hanahan и Weinberg, 2011). Према клиничкој слици коју дају и особинама разликују се два основна типа тумора: бенигни и малигни. Бенигни тумори расту и остају инкапсулирани те не врше инвазију у друга ткива (Ruddon, 2007). Малигни тумор означава групу хетерогених обољења коју генерално карактеришу процеси неконтролисане ћелијске пролиферације и деобе током којих ћелије стичу и потенцијал дисеминације (ширења) са места иницијалног настанка тумора ка другим ткивима, формирајући секундарне туморе. Метастатски процес укључује деструкцију околних ћелија, нарочито ендотелских ћелија крвних и лимфних судова, преживљавање трансформисаних ћелија у циркулацији, адаптацију на нове срединске факторе у ткиву, као и стицање способности избегавања имунског одговора организма. Способност дисеминације (метастатски потенцијал) најважнија је квалитативна разлика између бенигног и малигног тумора. Молекуларна основа неопластичних трансформација је одступање од оптималних циклуса одржавања хроматинског материјала, а приказ најчешћих хроматинских нестабилности које су у основи неопластичних измена здраве ћелије дат је на **Слици 1**.



**Слика 1.** Општи преглед неправилности хроматинске хомеостазе током неопластичне трансформације здраве ћелије

(преузето са сајта: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2493> и модификовано)



Малигни тумори су данас један од највећих изазова савремене медицине. Сваке године у свету од различитих облика малигнитета оболи више од 10 милиона људи, највише у економски развијеним земљама, као последица старења, али и усвајања седентарног начина живота, неадекватне исхране и пушења. У Србији је број оболелих и умрлих од малигнух тумора у непрекидном порасту, са актуелним трендом од око 30 000 новооболелих особа годишње, а малигне болести су одговорне за око 19% укупне смртности нације, због чега се налазе на другом месту, одмах иза кардиоваскуларних обољења (Šipetić Grujičić и сар., 2019).

И поред својих лимита, хемиотерапија остаје доминантан модел лечења, нарочито неоперабилних тумора или као допунска терапија након хирушких интервенција. Са порастом стандарда друштва у целини и глобализацијом тржишта, здравствена индустрија је добила простор за опсежна улагања у истраживања нових потенцијалних молекула унапређене антитуморске активности, израженије селективности који испољавају мање негативних ефеката на здрава ткива (Johnstone и сар., 2002; Alfarouk и сар., 2015). Већина тумора је резистентна на лечење услед учесталости коришћења типских терапија, посебно ако се дијагностикују у метастатској фази болести. Излечења су постигнута у области дечије онкологије, туморима тестиса и лимфомима, а значајно продужење живота могуће је применом лекова код тумора дебелог црева и тумора дојке (Gerber, 2008; Chen и Cleck, 2009). Услед тога, намеће се потреба за развојем нових ефикаснијих терапија. Нови лекови се испитују у *in vitro* условима, након чега улазе у вишегодишње клиничке студије на пацијентима.

Током последње деценије у лечењу малигнух тумора све више простора добија имунотерапија, нова грана модерне онкологије. Данашња имунотерапијска стратегија се заснива на теоретској основи да се развијају нереактивност и толеранција према присутном тумору. Применом имунолошких процедура и принципа код особа са малигнитетом, тумор се препознаје као „страно ткиво“ и развија се адекватан имунски одговор. Овај начин омогућава успостављање или побољшање неспецифичне и специфичне имунске реакције на туморске ћелије. Могућност производње добро дефинисаних имунских продуката и јасно разумевање имунских механизма омогућава развој више видова имунотерапије, која уз хирургију, зрачну терапију и хемиотерапију, представља најзначајнију врсту терапије болесника са малигнитетима. По својој природи имунотерапија може бити пасивна када се дају већ готови продукти (моноклонска антитела и *in vitro* стимулирани лимфоцити) или активна, када се примењују продукти који доводе до активног учешћа имунског система у развоју протективних антитуморских реакција (вакцине и имуномодулаторни агенси) (Abbas и сар., 2019).

## 1.2. Тумор дебелог црева

Тумор дебелог црева је најчешћи малигни тумор висцералних органа трбушне дупље и болест је високо развијених земаља. Представља други најчешћи узрок смрти узрокованих тумором у Србији, одмах после тумора плућа код мушкараца и тумора дојке код жена. Најчешће се јавља код мушкараца старости између 70 и 74 године, а код жена изнад 75 године живота (Krivokarić, 2018).

Генетске, физиолошке и епидемиолошке студије упућују на чињеницу да је за настанак тумора колона одговорна сложена интеракција наследних чинилаца и фактора спољашње средине. Постоје бројни фактори који могу индуковати мутације, које у једном тренутку доводе до малигне неопластичне трансформације ткива (Pritchard и Grady, 2011).

Највећи број тумора дебелог црева јавља се у спорадичном облику, док на настанак до 20% тумора дебелог црева утичу наследни чиниоци (Abdel-Rahman и сар., 2004). Бројне студије су потврдиле повезаност настанка тумора и исхране која садржи велике количине меса и животињских масти. Повећана количина животињских масти доводи до појачаног лучења жучних киселина које се разграђују цревним бактеријама. То доводи до стварања неких туморогених супстанци међу којима су до данас откривени фекапентени, 3-кетостероиди, продукти пиролизе, жучне киселине (посебно цитоколна) (Corrêa Lima и Gomes-da-Silva, 2005; Osvirk и O'Keefe, 2017). Са друге стране, високи удео рибе у исхрани смањује ризик од настанка тумора дебелог црева (Lüchtenborg и сар., 2005).

Тумори дебелог црева су погодан модел систем за проучавање генетске основе настанка и развоја тумора. Сматра се да је већина тумора дебелог црева последица вишестепеног процеса, током којег из доброћудног аденома као последица наслеђених и/или стечених мутација настаје малигни (инвазивни) тумор. Гени у којима су најчешће утврђене промене у туморима дебелог црева су тумор супресорски гени *APC* (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli*), *MCC* (енгл. *Mutated in Colon Cancer*), *DCC* (енгл. *Deleted in Colon Cancer*), *DPC4* (енгл. *Deleted in Pancreatic Carcinoma 4*), *p53* и *nm23-H1* (Henderson и Fagotto, 2002; Каритановић и сар., 2004). За разлику од онкогена чија активација може довести до малигне трансформације ћелије, тумор-супресорски гени делују антагонистички, па њихове делеције или мутације које кодирају нефункционални протеин могу бити основа за развој тумора.

За тумор дебелог црева карактеристичан је тумор-супресорски ген *DCC* који је као што и име наговештава делетиран у туморским ћелијама дебелог црева, као и мутирани тумор-супресорски ген *p53* који онда не спречава прелазак ћелије из G1 у S фазу ћелијског циклуса, чиме се спречава активација апоптозе. Стога се *p53* онкоген назива и „контролором генома“. Мутације *p53* гена су најчешће промене онкогена у људским туморима: утврђене су у 60% свих малигнух неоплазми, а од тога у 100% микроцелуларних тумора плућа и 70% тумора дебелог црева. Повезују се и са тумором дојке, коре надбубрежне жлезде, саркомима, леукемијама и туморима мозга (Kern и сар., 2002). Узрок туморогенезе је смањење у експресији *APC* гена (Nieuwenhuis и сар., 2007). *APC* је нормално експримиран у здравим епителним ћелијама дебелог црева. Његов продукт је протеин од 310 kDa локализован и у нуклеусу и у цитоплазми. Способност умножавања и инвазивност туморских ћелија се повезују са поремећајем *p53*. Експресија *APC* гена је регулисана бета-катенин Wnt сигналним путем. Тај пут је важан у органогенези, ћелијској пролиферацији и мотилитету органа. Мутације у гену за *APC* повећавају стабилност и транскрипцијску активност бета-катенина. Бета-катенин се у даљем току везује за транскрипциони фактор 4 (енгл. *Transcription factor 4*, Tcf4). Комплекс бета-катенин/Tcf4 регулише протоонкоген с-мус, циклин D (G1/S-регулатор), матриксне металопротеиназе (енгл. *Matrix Metalloproteinase*, MMP) и транскрипционе факторе с-jun и fra-1. *APC* утиче на интегритет актинског цитоскелета, међућелијску адхезију и миграцију ћелија (Olmeda и сар., 2003).

У регулацији ћелијске деобе делује и педесетак протоонкогена чији су производи смештени у разним деловима ћелије, а експримирани су у различитим производима. Протоонкогени могу деловати као фактори раста (*Sis*, *Hrs*), као рецептори за факторе раста, група трансмембранских рецептора (*Erb-B*, *Ras*, *Neu*), затим као протеини у цитоплазми (*Raf*) и коначно као протеини смештени у једру (*p53*, *Fos*, *Jun*, *Myc*). Сматра се да управо мутација једног од ових гена покреће трансформацију нормалне епителне ћелије дебелог црева. Даља акумулација мутација води прогресији тумора, по принципу „аденом–карцином–метастазе“ (Olmeda и сар., 2003).

### 1.3. Тумор дојке

Тумор дојке је у развијеним земљама најучесталији малигни тумор код жена. Ризична група су пре свега особе са генетском предиспозицијом, а затим и особе које воде неуредан начин живота (лоша исхрана, физичка неактивност) и нередовни лекарски прегледи.

Поремећен менструални циклус (нпр. рана менарха, касна менопауза), такође је фактор ризика. У породицама са високом учесталосту тумора дојке пронађене су мутације *BRCA1* и *BRCA2* тумор супресор гена. Највећи ризик за појаву овог тумора, што се наслеђа тиче имају жене чије су мајке имале билатералан карцином пре менопаузе (имају девет пута већи ризик да оболе). Ризик од појаве ове врсте тумора се повећава са годинама (највећи је у периоду између 40 и 50 година). Такође гојазност и лоша исхрана, пре свега претеран унос масти животињског порекла, хетероциклични амини који настају при пржењу хране, могу поспешити настанак болести. Физичком активношћу, уносом воћа, поврћа и свих природних витамина и антиоксиданаса, може се допринети како превенцији, тако и лечењу (Тугер и сар., 2004; Boranić, 2006). У постменопаузи се за највећи узрок настанка тумора сматра гојазност, јер је масно ткиво највећи извор естрогена. Након 60. године живота, жене са повећаном телесном масом (ако имају 10 килограма у вишку) имају 80% већи ризик од настанка тумора дојке (Džodić и сар., 2014).

Истраживања показују да жене које имају мутацију на *BRCA1* или *BRCA2* гену имају 45-85% вероватноће да оболе (Levenat и Levačić, 2010). Већина тумора дојке је хормонски зависна, односно хормон-рецептор позитивна. Око 70% пацијенткиња има тумор који испољава експресију естрогена или прогестерона, односно рецептора за естроген или рецептора за прогестерон. Код тзв. естрогенских тумора, естроген представља главни фактор раста тумора, што је битан податак за лечење јер се употребљавају лекови чији је главни механизам деловања блокирање естрогена. Они могу да делују на деградацију естрогенских рецептора, или на смањену продукцију естрогена у туморском ткиву. Међутим, као и код хемиотерапеутика и овде се као главни проблем јавља резистенција (Lumachi и сар., 2015). Услед постојања великог броја рецептора за епидермални фактор раста, долази до појачане пролиферације, који поспешује раст трансформисаних ћелија. Тумори који имају већи број ових рецептора су отпорнији на хемиотерапију. Лечење се своди на инхибицију ових рецептора и успоравање раста тумора (Wee и Wang, 2017).

Тумор дојке је најчешћи малигни тумор код жена широм света. У Европи је смртност од тумора дојке на годишњем нивоу око 60 000 жена. У популацији жена у свету тумор дојке чини 22,9%. Према подацима до 2015. године, од свих дијагностикованих тумора код жена у Централној Србији, чак 24,1% је тумор дојке (Miljuš и сар., 2017). Код трећине жена у Србији у тренутку постављања дијагнозе ради се о болести у раном стадијуму, а готово две трећине жена има регионално проширену болест или регионалне метастазе. Ови подаци недвосмислено указују на смањену шансу за њихово излечење, стога је проценат смртности (морталитет) од ове болести у Србији веома висок (18,9%) (Miljuš и сар., 2017). У САД и Европи се највише напредовало на пољу раног дијагностиковања, па се тумор дојке величине до 2 cm дијагностикује у 70-80% случајева, док у Србији тај проценат износи свега 20%. Најновији подаци показују да је у Србији стопа петогодишњег преживљавања од тумора дојке мања од 55%, што наводи на потребу што хитнијег увођења индивидуализованог третмана ове болести у клиничку праксу (Filipović и сар., 2007).

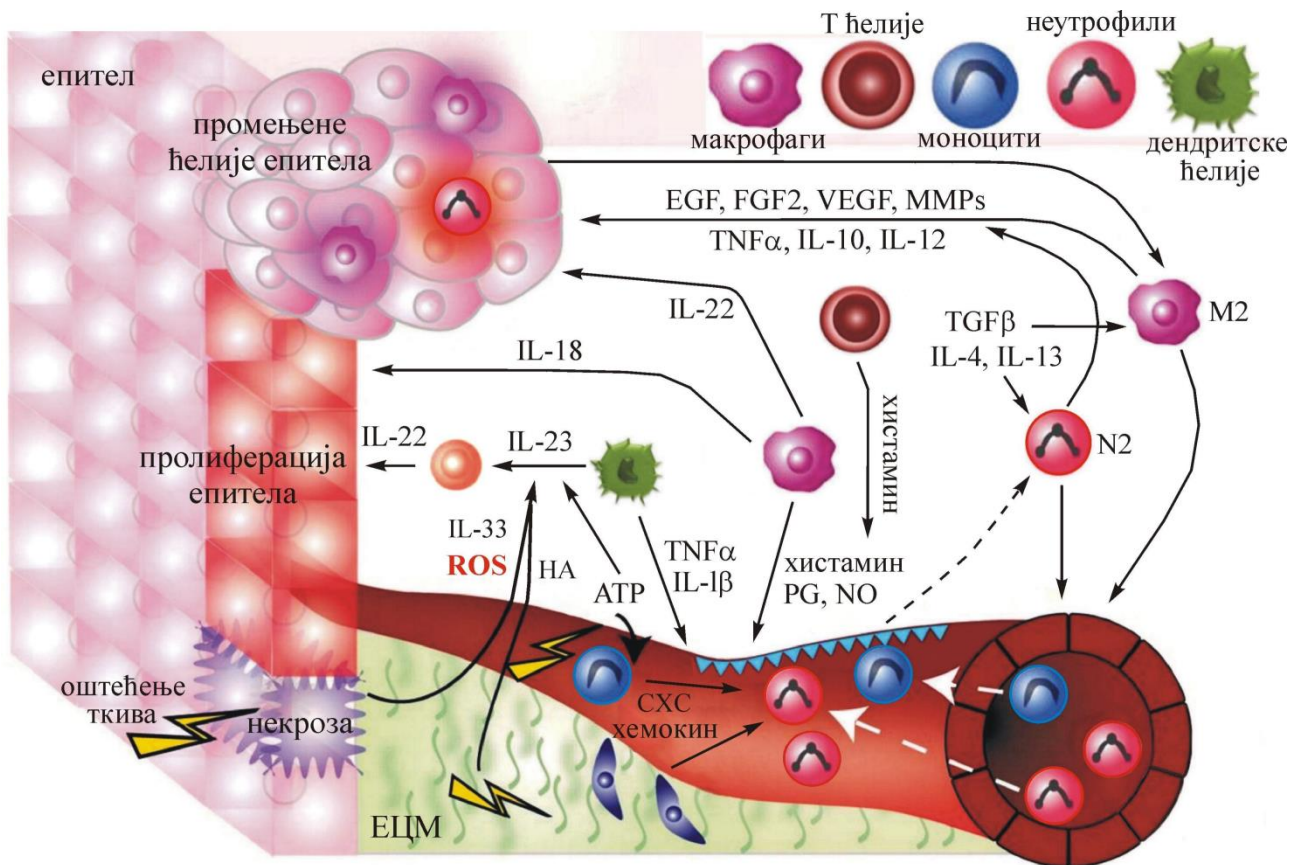
Учесталост тумора дојке код жена у Србији постепено се повећава са старошћу до 60. године живота, након чега полако почиње да опада. Највећа узрасно-специфична стопа инциденце тумора дојке код жена је забележена у старосној групи између 55 и 65 година

(Miljuš и сар., 2017). Генетски фактори су одговорни за 5 до 10% случајева тумора дојке и повезани су са мутацијама у генима *BRCA1* и *BRCA2*. Међутим, код ћелија тумора, стрес доводи до високих концентрација слободних радикала, које превазилазе могућности заштитних и репаративних система ћелије, те се повећава учесталост мутација (Jackson и сар., 2001; Cipollini и сар., 2004).

#### 1.4. Иmunски одговор против тумора

Настанак тумора, раст и метастатска прогресија су сложени процеси који, да би били успешни, захтевају висок степен ћелијске пластичности. Слабљење међућелијских веза и активација протеолитичких ензима, MMP, који разграђују међућелијски матрикс и олакшавају продирање малигнућ ћелија у околна ткива последица је инвазивности туморских ћелија и способности насељавања околног ткива (Слика 2) (Hua и сар., 2011; Nowarski и сар., 2013), док процес метастазе представља излазак појединачних малигнућ ћелија са места примарног тумора кроз крвоток и/или лимфоток и насељавање удаљених ткива (Katić и сар., 1997).

Молекули ослобођени из некротичних ћелија оштећеног ткива или новоформирани антигени активирају одговарајуће рецепторе на дендритским ћелијама, макрофагама, мастоцитима и циркулишућим моноцитима, што доводи до њихове активације и продукције медијатора инфламације фактора некрозе тумора  $\alpha$  (енгл. *Tumor Necrosis Factor Alpha*, TNF- $\alpha$ ), интерлеукин 1 $\beta$  (енгл. *Interleukin 1 beta*, IL-1 $\beta$ ), простагландина (енгл. *Prostaglandins*, PG), хистамина и азот оксида (енгл. *Nitric Oxide*, NO). Услед активације ендотелних ћелија и производње СХС хемокина од стране ћелија урођеног имунитета и стромалних ћелија регрутују се неутрофили из циркулације. У исто време, активација инфлазома доводи до регулисане продукције IL-1 $\beta$  и IL-18. Ефекат продукованог IL-18 се огледа у индукцији продукције IL-23 од стране дендритских ћелија и IL-22 од стране лимфоидних прогениторских ћелија чиме се подстиче регенерација епитела. Регрутовани неутрофили који се инфилтрирају у тумором захваћеном ткиву посредују у регрутовању инфламаторних моноцита који се диференцирају у ткивне макрофаге и подстичу даље регрутовање моноцита. Фенотип активираних неутрофила (N2) и макрофага (M2) помоћу фактора трансформације раста  $\beta$  (енгл. *Transforming Growth Factor Beta*, TGF- $\beta$ ), IL-4 и IL-13 промовише продукцију протуморских медијатора као што епидермални фактор раста (енгл. *Epidermal Growth Factor*, EGF), фактор раста фибробласта (енгл. *Fibroblast Growth Factor-2*, FGF-2) и фактора раста васкуларног ендотела (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Дуготрајна инфламаторна сигнализација може промовисати туморогенезу губитком интегритета епителне баријере и продуженом продукцијом IL-22 (Nowarski и сар., 2013). Урођени имунски одговор на неопластичне трансформације и последично оштећење ткива приказан је на Слици 2.



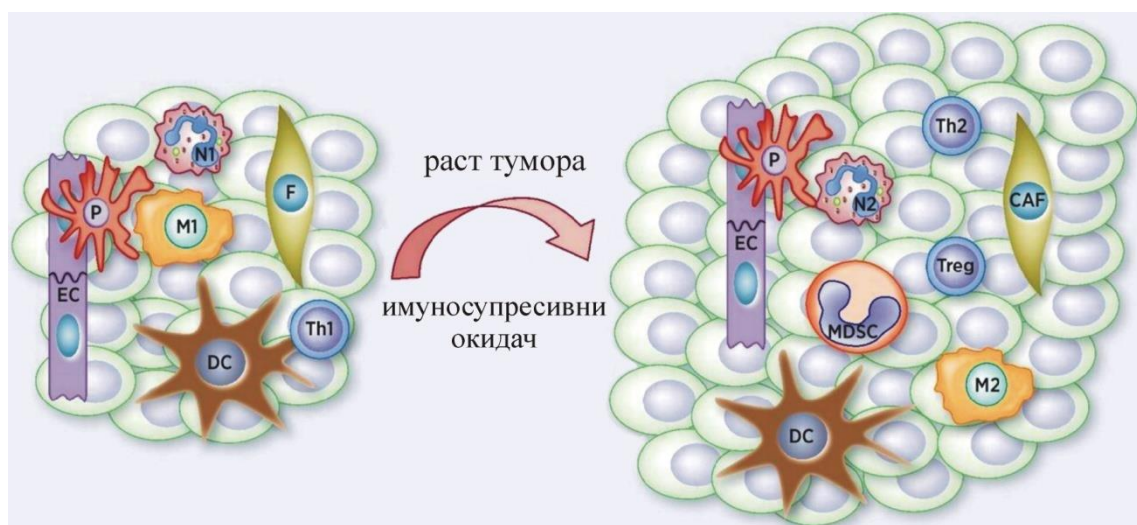
**Слика 2.** Урођени имунски одговор на неопластичне трансформације и последично оштећење ткива (преузето из: Nowarski и сар., 2013 и модификовано)

ЕЦМ - екстрацелуларни матрикс; ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*) - реактивне врсте кисеоника; HA (енгл. *Hyaluronic Acid*) - хијалуронска киселина; MMP (енгл. *Matrix Metalloproteinase*, MMP) - матриксне металопротеиназе; PG - простагландин; NO - азот оксид; фенотип активираних неутрофила (N2) и макрофага (M2).

Један од најзначајних аспеката туморског ткива је способност његових ћелија да ефикасно избегну деловање имунских механизма организма, иако трансформисано туморско ткиво поседује нове антигене који имају одређени имуногени потенцијал. Туморске ћелије су пореклом од ћелија здравог ткива настале у процесу туморогенезе, током кога долази до испољавања неких до тада непостојећих антигена. Услед ових карактеристика, антигени тумора могу да буду у већој или мањој мери имуногени, односно могу да изазову имунски одговор, али је такође чест случај да је имунски одговор организма јако ослабљен или да готово у потпуности изостаје (Gonzalez и сар., 2018). Микроокружење тумора чине цитотоксичне CD8<sup>+</sup> ћелије, дендритске ћелије, макрофаги и неутрофили који у нормалним условима могу елиминисати трансформисане ћелије. Неefикасност ћелијског имунског система да благовремено елиминише трансформисане ћелије, која води настанку макроскопских тумора, може да буде последица сличности између туморских и аутологих ткивних антигена, за које је већ успостављена централна имунска толеранција (Granot и Fridlender, 2015). Поред тога, неправилна обрада и презентација антигена, као и недостатак експресије адекватних костимулаторних сигнала могу довести до развоја нефункционалних и/или анергичних ефекторских ћелија чиме се смањује делотворност имунског надзора. У исто време, сам тумор може даље да одржава имunosупресивно стање у својој микроокolini, синтетишући и ослобађајући регулаторне молекуле који индукују значајне



функционалне промене суседних здравих ћелија, што је у директној вези са даљим прогресом тумора. Услед цитокинског и хемокинског дисбаланса, у туморско ткиво мигрирају антиген-презентујуће ћелије чија измењена функција доводи до амплификације имуносупресивног имунског одговора. У туморском микроокружењу повећано је присуство и активност регулаторних Т лимфоцита (енгл. *Regulatory T cells*, Treg) који продукују имуносупресивне цитокине као што су IL-10 и TGF- $\beta$  који заједно са VEGF продуктованим од стране туморских ћелија, ометају имунски одговор и доприносе развоју имуносупресије у туморском ткиву (Wang и DuBois, 2015). Резидентни макрофаги и неутрофили у туморском ткиву се карактеришу смањењем реактивности, а присутан је и велики број имуносупресорских мијелоидних ћелија (енгл. *Myeloid Derived Suppressor Cells*, MDSC). Стромалне ћелије, укључујући ендотелне ћелије, периците и туморске фибробласте, стичу јединствена својства која стимулишу развој тумора у њиховом микроокружењу (Granot и Fridlender, 2015) (Слика 3).



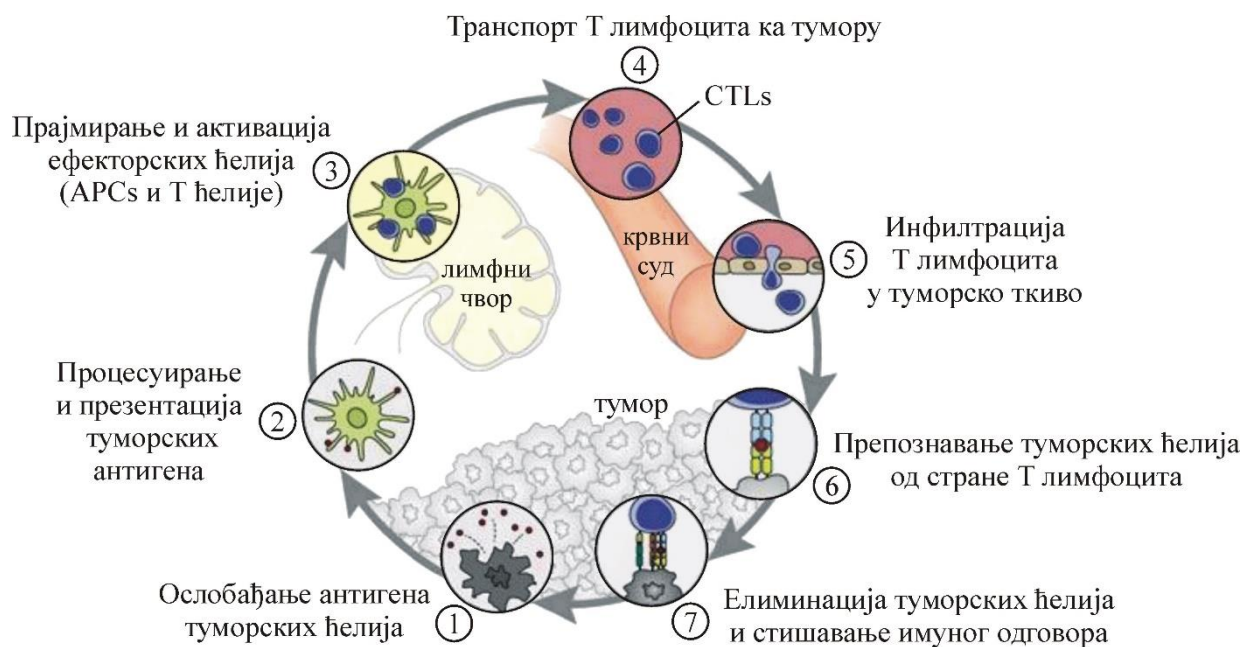
**Слика 3.** Деловање имуносупресорских сигнала туморског ткива на здраво ткиво у окружењу (преузето из: Granot и Fridlender, 2015 и модификовано)

Th1, Th2 (енгл. *T helper*, Th) - помоћнички Т лимфоцити; M1, M2 - макрофаги; N1, N2 - неутрофили; Treg - регулаторне Т ћелије; DC - дендритске ћелије; F - фибробласти; CAF - туморски фибробласти; P - периците; EC - ендотелне ћелије.

Туморске ћелије су развиле различите механизме у циљу ефикасног избегавања програмиране ћелијске смрти - апоптозе, најчешће губитком функције одређених регулаторних протеина укључених у процес егзекуције апоптозе (Hanahan и Weinberg, 2011; Wong, 2011). Ове ћелије могу стећи способност одржавања пролиферативне сигнализације на неколико алтернативних начина, могу произвести лиганде фактора раста, на које могу реаговати путем експресије когнитивних рецептора, што резултира аутокриним пролиферативном стимулацијом (Cheng и сар., 2008; Hanahan и Weinberg, 2011). Потребе за кисеоником и хранљивим материјама се повећавају са прогресијом тумора, па туморско ткиво синтетише ангиогенетске молекуле, индукујући формирање нових крвних судова (Hanahan и Folkman, 1996).

Основни принципи анализа у туморској имунологији представљају одређивање карактеристика туморских антигена, истраживања механизма њиховог препознавања као и ефекторске реакције којима се могу уклонити клонови малигних ћелија који би имунски

систем носиоца тумора могао да препозна као стране и елиминише их својим специфичним и неспецифичним ефекторским механизмима. На основу оваквог понашања имунског одговора, конституисана је теорија имунолошког надзора. Да би се реализовала ефикасност антитуморског имунског одговора, потребно је да се одвије читава серија сукцесивних, регулисаних догађаја који се означава као циклус туморске имуности, који омогућава ефикасно препознавање туморских неоантигена, ефикасан одговор у елиминацији/неутрализацији туморских ћелија и адекватно одржавање системске имунске хомеостазе без прекомерних оштећења здравог ткива (Слика 4) (Chen и Mellman, 2013). Покретање имунског одговора против тумора је цикличан процес који је самопропагирајући што води брзој акумулацији имуностимулаторних фактора који треба да ојачају и прошире одговор цитотоксичних Т лимфоцита. У циклусу такође постоје и инхибиторни фактори који обезбеђују повратне регулаторне механизме што води ограничавању интензитета имунског одговора.

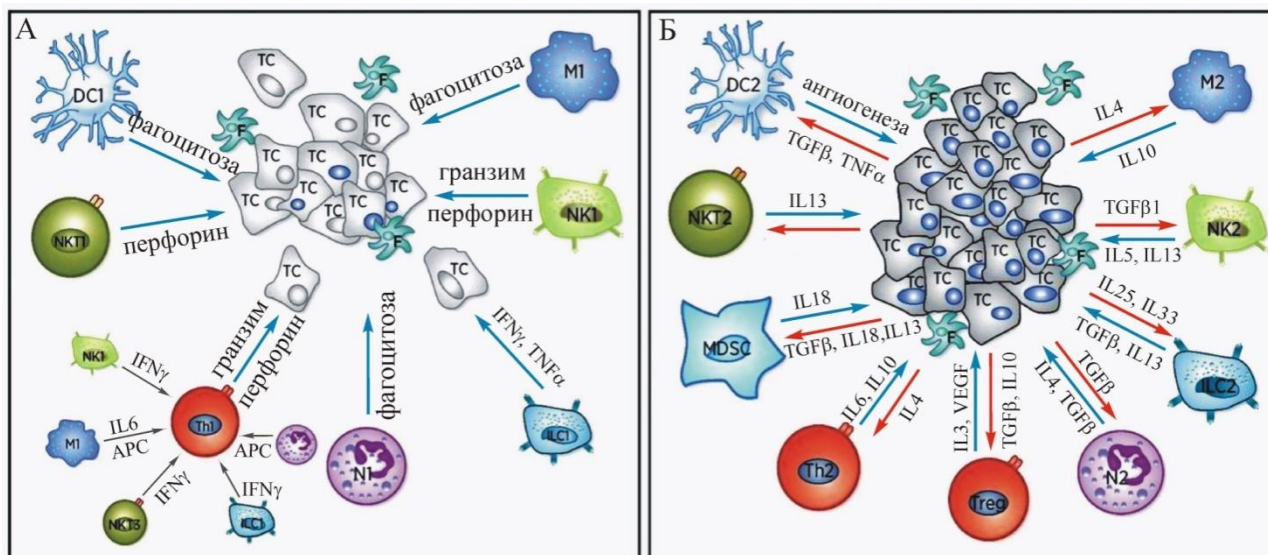


**Слика 4.** Циклус имунског одговора на тумор (преузето из: Chen и Mellman, 2013 и модификовано)

APCs (енгл. *Antigen presenting cells*) – антиген-предентујуће ћелије; CTLs (енгл. *Cytotoxic T lymphocytes*) – цитотоксични Т лимфоцити.

Неоантигени настали током туморогенезе се ослобађају из ткива тумора и бивају препознати од стране дендритских ћелија и приказани у склопу главног комплекса ткивне подударности (енгл. *Major Histocompatibility Complex*, МНС) молекула што резултира активацијом ефекторских Т лимфоцита против тумор-специфичних антигена. Активација Т ефекторских лимфоцита зависи од стања регулаторних Т лимфоцита (ћелија које имају улогу у имунској толеранцији). Активирани ефекторски Т лимфоцити врше инфилтрацију ткива тумора, специфично препознају антиген у склопу МНС молекула посредством Т ћелијског рецептора, везују се за туморске ћелије и долази до испољавања ефекторских функција које омогућавају елиминацију ћелија тумора (Motz и Coukos, 2013). Оштећене туморске ћелије ослобађају нове количине неоантигена појачавајући снагу имунског одговора и

регенеришући на тај начин циклус. Међутим, сама експресија туморских антигена не гарантује да ће се покренути имунски одговор и да ће се спречити раст тумора. Како би избегао имунски надзор који је усмерен против туморских имуногених антигена, тумор развија имунску резистенцију избегавајући имунску машинерију. Ово често може бити последица одсуства и/или смањене експресије МНС молекула чиме је онемогућена (или отежана) презентација туморских антигена специфичним цитотоксичним Т лимфоцитима у већини тумора. Поред овог механизма тумор избегава имунски одговор и селектовањем интеракција са мање имуногеним ћелијама. Додатни механизам којим тумор избегава имунски одговор је успостављање пермисивног окружења продукцијом имunosупресивних молекула и интеракцијама самих туморских ћелија са имунским ћелијама због чега успева да се развије у клинички видљиву ткивну масу (Слика 5). У ткиву самог тумора различити имunosупресивни елементи у које спадају цитокини (IL-10, TGF- $\beta$ ), солубилни сигнални молекули и одређене ћелије заједно граде мрежу која инхибира антитуморски имунски одговор организма чиме доприносе његовој прогресији (Shimizu и сар., 1999; Nishikawa и Sakaguchi, 2014).



Слика 5. А – Реакције ћелија имунског система на туморско ткиво; Б – Развој имunosупресије у туморском окружењу (преузето из: Hinshaw и Shevde, 2019 и модификовано)

Th1, Th2 - помоћнички Т лимфоцити; N1, N2 - неутрофили; M1, M2 - макрофаги; NK1, NK2 - ћелије природне убице; DC1, DC2 - дендритске ћелије; Treg - регулаторне Т ћелије; TC - туморске ћелије.

Због свега наведеног, код пацијената оболелих од тумора, циклус туморске имуности се не одвија оптимално, јер неоантигени могу остати препознати, Т лимфоцити могу третирати неоантигене као неимуногене, аутологе молекуле организма и због тога могу да створе супресорски одговор посредован регулаторним Т лимфоцитима, пре него адекватну ефекторску активност (Motz и Coukos, 2013).

### 1.5. Ћелијски циклус и апоптоза

Догађаји који се одвијају између две ћелијске деобе, укључујући и саму ћелијску деобу чине ћелијски циклус. Ћелијски циклус се дели на две основне фазе: фаза деобе (М



фаза) и интерфаза. У току М фазе (митозе), врши се кариокинеза - подела једровог материјала и цитокинеза - подела цитоплазме. Ово је најкраћа фаза циклуса. Интерфаза је период између две М фазе ћелијског циклуса и представља период између две деобе. Она је најдужа фаза у животу ћелије и тада се дешавају сложени биолошки процеси који доводе до дупликације генетичког материјала и дистрибуције у ћелијама. У овој фази ћелијског циклуса ћелија се припрема за деобу, и уочене су три фазе: G1 фаза, S фаза и G2 фаза (Hindley и Philpott, 2013).

Током S фазе, одвија се репликација, односно синтеза нуклеусне ДНК, док се у фазама G1 и G2, одвија синтеза молекула, али не и ДНК. Током интерфазе у ћелији се одвија транскрипција гена и синтеза РНК и протеина неопходних за раст и деобу ћелије, као и за контролу и одвијање ћелијског циклуса. G1 и G2 фаза омогућавају додатно време ћелији да удвостручи количину ћелијских органела за ћерке ћелије. Ћелије које се не деле или веома ретко, напуштају ћелијски циклус у фази G1 и улазе у фазу G0 или фазу мировања, у којој ћелије могу да остану дужи временски период или трајно, као на пример већина неурона. Ћелијски циклус је сложен и организован процес током кога се врши репликација ДНК и умножавање ћелијских компоненти пре деобе. У свакој фази ћелијског циклуса постоје контролне тачке, у којима ови сложени механизми регулације обезбеђују прогресију ћелијског циклуса у жељеном смеру (Petrović и Todorović, 2014). У самој ћелији присутни су унутрашњи контролни фактори (генетски) који утичу на ток и трајање појединих фаза ћелијског циклуса, и делују стимулаторно или инхибиторно на одређене активности ћелије. Унутрашњи фактори су протеини које ћелија углавном синтетише у G1 фази. У регулацији ћелијског циклуса важну улогу имају три групе протеина: циклини, циклин зависне киназе и инхибитори циклин зависних киназа. Циклин зависне киназе (енгл. *Cyclin-dependent kinases*, Cdk) су ензими који врше фосфорилацију кључних протеина нуклеоплазме и цитосола, и тако их активирају (Fisher и сар., 2012).

Почетни период ћелијског циклуса (G1 фаза) је најваријабилнија и најдужа фаза ћелијског циклуса, период који обухвата раст ћелије и утиче на дужину ћелијског циклуса. G1 фаза се састоји од припреме ћелије за репликацију и одвија се од краја М фазе до почетка нове репликације ДНК. У G1 фази ћелије синтетишу РНК, регулаторне протеине и ензиме који су неопходни за репликацију ДНК, као и молекуле који су значајни за њихову функцију. У току ове фазе ћелија доноси кључну одлуку да ли да започне нов циклус ћелијске деобе или не, да ли да остане привремено или трајно ван ћелијског циклуса у тзв. G0 фази. Исход одлуке зависи од присуства и врсте фактора раста (митогена), интеракције са ванћелијским матриксом и другим ћелијама (контактна инхибиција). На контролу, ток и трајање фаза ћелијског циклуса поред унутрашњих фактора утичу и спољашњи епигенетски фактори. Спољашњи контролни фактори су сигнални молекули који се везују за рецепторе на ћелијској мембрани и преко њих покрећу каскаду интрацелуларних реакција које резултују експресијом гена одговорних за регулацију ћелијског циклуса. Фактори раста делују преко специфичних рецептора на ћелији и најчешће дају сигнал за започињање ћелијског циклуса и синтезу циклина Д који се синтетише све док постоји стимулација факторима раста, док одсуство фактора раста спречава улазак ћелије у деобу (Hindley и Philpott, 2013).

У току S фазе ћелијског циклуса у једру се одвија најважнији период припреме за ћелијску деобу, репликацију ДНК и удвостручавање генетичког материјала, што временски представља најдужу фазу ћелијског циклуса. За прелазак ћелије у S фазу важну улогу имају регулатори ћелијског циклуса циклин А и Е, као и ензими потребни за синтезу и репликацију ДНК. Унутрашњи контролни фактори испољавају утицај на ћелијски циклус тако што

иницирају репликацију ДНК и прелазак из G1 фазе у S фазу, или емитовањем сигнала за почетак деобе и прелазак из G2 фазе у M фазу (Petrović и Todorović, 2014).

Ћелијски механизми, као што су контрола ћелијског циклуса, процес пролиферације, диференцијације и ћелијског метаболизма су у вези са молекуларним механизмима који регулишу процес апоптозе. Настала оштећења, под дејством различитих хемијских и физичких агенаса на молекулу ДНК, као и спонтано услед дефекта у механизму репарације ДНК, у зависности од врсте и степена, доводе до тога да ћелија, наставља прогресију кроз ћелијски циклус, или активира механизме који је воде у апоптозу (Nicholson, 2000).

Апоптоза је контролисани начин ћелијског умирања и представља облик програмиране ћелијске смрти, у коме ћелија активно учествује, спроводећи прецизан, генетски регулисан програм самодеструкције, тј. ћелијског „самоубиства“ (Adrain и Martin, 2009).

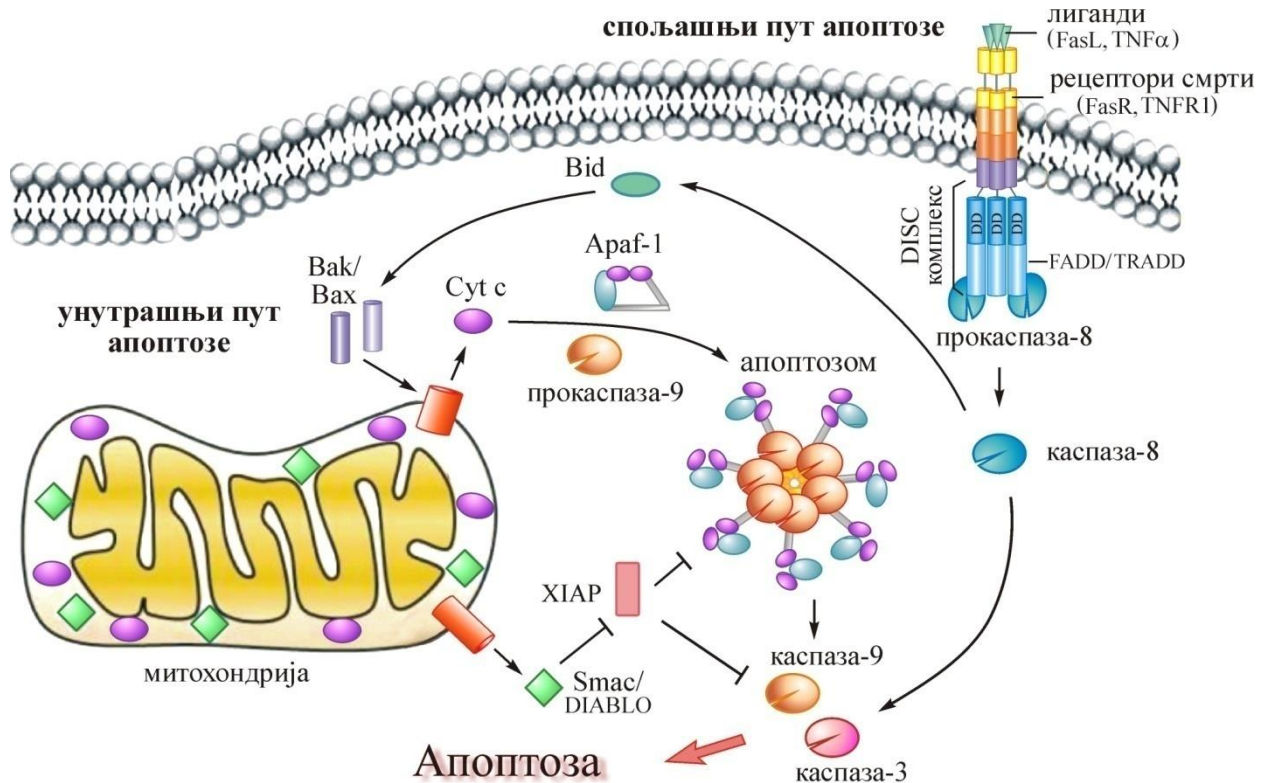
Апоптоза је диригована великим бројем протеина неопходних за функционисање сигналних путева ћелија тумора и врло је битан процес у заустављању неконтролисане пролиферације ћелија (Nicholson, 2000). Типични догађаји у процесу апоптозе су промене на нивоу ћелијске мембране, премештање молекула фосфатидил-серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране, унакрсно повезивање протеина и смањење запремине ћелија, кондензација хроматина, цепање једарне ДНК и формирање великих цитоплазматичних везикула које се одвајају од ћелијске површине (Adrain и Martin, 2009).

Апоптозу одликује карактеристични скуп морфолошких и биохемијских особина, при чему ћелије пролазе кроз каскаде самоуништења. Стога, правилно регулисање апоптозе је од суштинског значаја за одржавање нормалне ћелијске хомеостазе. Реактивне врсте кисеоника имају централну улогу у ћелијској сигнализацији, као и у регулацији главних путева апоптозе посредоване митохондријама, рецепторима смрти и ендоплазматичним ретикулумом (Taylor и сар., 2008).

Морфолошке промене у току процеса апоптозе се деле на промене ране и касне фазе апоптозе. Рана апоптоза представља промене које се односе на прве промене које се уочавају на ћелији која је започела процес апоптозе. Први морфолошки знак апоптозе је кондензација хроматина, најчешће у маргиналним областима нуклеуса. У раној фази апоптозе, заједно са променама хроматина долази и до кондензације цитоплазме која доводи до смањења запремине ћелије, уз повећање густине цитоплазме, сабијања интактних органела и разградње цитоскелета. Касна апоптоза је онај стадијум апоптозе код кога је дошло до дезинтеграције ћелијске мембране и пикнозе, а кондензовани хроматин на периферији нуклеусне мембране се фрагментире. Током ове фазе апоптозе неке од морфолошких карактеристика укључују и фрагментацију једра и цитоплазме, модификацију органела, као и деформацију ћелијске мембране услед одвајања цитоскелета од мембране. Завршна фаза процеса апоптозе доводи до појаве фрагмената апоптотске ћелије који су окружени ћелијском мембраном и називају се апоптотична телашца (Hajra и Liu, 2004).

Досадашња истраживања показују да постоје два главна апоптотска пута: спољашњи (пут рецептора смрти) и унутрашњи (митохондријални пут). Ова два пута су међусобно повезана и учесници једног пута могу утицати на други. Разумевање механизма апоптозе је од кључног значаја и помаже у разумевању поремећаја апоптозе. Апоптоза је координисан, енергетски зависан процес, који подразумева активирање групе цистеин протеаза (каспаза) и каскаду догађаја који повезују покретачки стимулус водећи ћелију у коначну смрт. Каспазе

имају централно место у механизму апоптозе, јер су уједно и индуктори (иницијатори) и егзекутори (извршиоци). Постоје три пута којима каспазе могу да се активирају. Два најчешће описана пута иницијације су унутрашњи (митохондријални) и спољашњи (рецепторски), покренут рецепторима смрти, пут апоптозе. Оба пута на крају доводе до заједничког исхода, односно до извршне фазе апоптозе. Трећи, мање познат, иницијални пут је унутрашњи пут ендоплазматичног ретикулума (енгл. *Endoplasmatic Reticulum*, ER) (Igney и Krammer, 2002). Спољашњи и унутрашњи пут конвергирају ка истом путу егзекуције (Слика 6).



Слика 6. Схематски приказ спољашњег и унутрашњег пута апоптозе (преузето из: Fogg и сар., 2011 и модификовано)

Спољашњи пут се иницира везивањем ванћелијског сигналног молекула „лиганда смрти“ за одговарајући рецептор на ћелијској мембрани, или деловањем ензима цитотоксичних Т лимфоцита и NK ћелија. Лиганд може да буде интегрисани мембрански протеин друге, суседне ћелије, или солубилни екстрацелуларни протеин (Finnberg и El-Deiry, 2008).

Унутрашњи пут апоптозе покрећу унутарћелијски сигнали смрти који се најчешће активирају као одговор ћелије на различите облике стреса. Интензитет и дужина трајања стреса представљају кључне факторе у одлуци ћелије да активира програм свог самоуништења. Комплекс ових сигнала је усмерен ка митохондријама доводећи до дисфункције ове органеле ослобађањем апоптотских протеина у цитосол и активацији каспаза (Wei и сар., 2008).

Поред митохондрија као централне органеле унутрашњег пута апоптозе, ER значајно доприноси процесу апоптозе, а сходно неким подацима и независно од митохондрија. Када је ER оштећен током ћелијског стреса, неки унутрашњи стимулуси као што су арахидонска

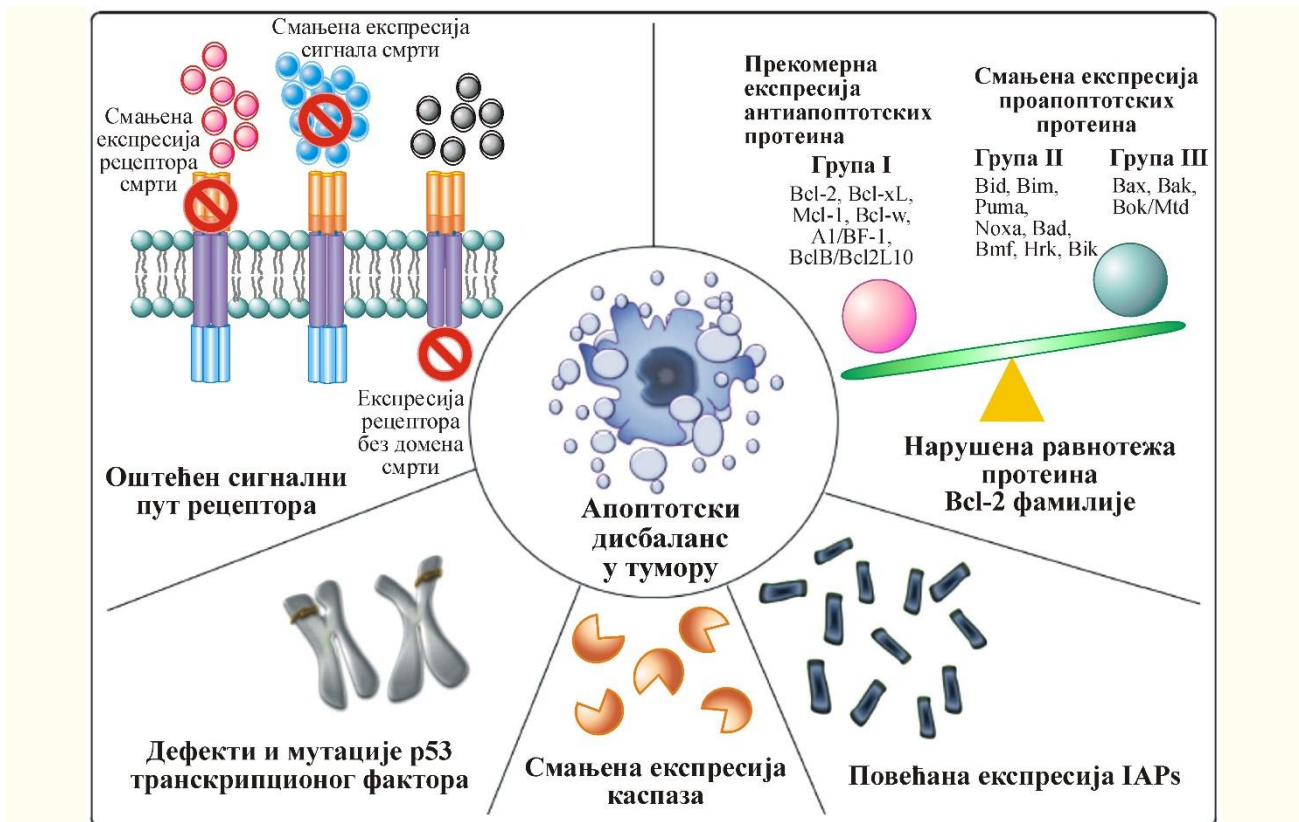
киселина, хипоксија, оксидативни стрес или хипогликемија, доводе до смањења синтезе протеина, и захтевају деловање овог пута активације за постизање ћелијске смрти. Централни механизам се приписује повећању интрацелуларне концентрације цитохрома Ц, а инфлукс је стимулисан деловањем *Bax* или *Bak* протеина, који се осим у митохондријалној мембрани налазе и на ER мембрани (Oda и сар, 2000).

Каспазе имају одлучујућу улогу у егзекуцији програмиране ћелијске смрти. У току процеса апоптозе каспазе могу остварити директну и индиректну активност. Директна активност каспаза се огледа у способности да делују на интегритет ћелијске структуре (Evan и Littlewood, 1998), док је инхибиција протеина који промовишу ћелијски раст и преживљавање последица индиректне активности каспаза. У оквиру ових протеина спада и фамилија Bcl-2 протеина која испољава директно апоптотско деловање (Hengartner, 2000). Каспазе се налазе у облику проензима у ћелијској цитоплазми, а могу се активирати аутокаталитички или неком другом активном каспазом. У раној фази апоптозе спољашња мембрана митохондрија постаје пропустљива за протеине, што доводи до отпуштања растворљивих интермембранских митохондријских протеина, док на унутрашњој мембрани долази до слабљења трансмембранског потенцијала што може послужити као показатељ раних апоптотских промена у *in vivo* условима. Важну улогу у модулацији апоптотског процеса имају и инхибиторни протеини апоптозе, који спречавају апоптозу директним блокирањем каспаза (Nowsheen и Yang, 2012).

Способност ћелија тумора да редукују ниво апоптозе и повећају резистенцију на про-апоптотске сигнале игра одлучујућу улогу у туморогенези. Постоји више начина на које туморска ћелија постиже овакав исход. Механизми којима се избегава апоптоза могу се сврстати у три категорије: 1) нарушавање баланса про-апоптотских и анти-апоптотских протеина 2) редукција функције каспаза и 3) ремећење сигнализације посредоване рецепторима смрти (Слика 7).

Многи протеини испољавају про-апоптотску или анти-апоптотску активност у ћелији. Однос ових протеина регулише сигнализацију која индукује апоптозу. Једна од најзначајних регулаторних група протеина укључених у процес апоптозе, нарочито унутрашњег пута егзекуције су Bcl-2 фамилија протеина (Gross и сар., 1999). Поремећен баланс про-апоптотских и анти-апоптотских Bcl-2 протеина резултује у снижавању степена апоптозе у погођеним ћелијама. Овакав ефекат може да буде последица појачане експресије анти-апоптотских протеина или снижавања нивоа експресије про-апоптотских протеина, или комбинације обе могућности.

Raffo и сарадници су показали да прекомерна експресија про-апоптотског Bcl-2 протеина штити ћелије тумора простате од апоптозе (Raffo и сар., 1995), док је студија Fulda и сарадника показала да прекомерна експресија Bcl-2 доводи до инхибиције TRAIL-индуковане апоптозе у неуробласту, глиобласту и тумору дојке (Fulda и сар., 2000). Прекомерна експресија неких чланова Bcl-xL фамилије протеина у основи је резистенције на велики број хемиотерапеутика у туморским ћелијама (Minn и сар., 1995). Код тумора дебелог црева са микросателитским нестабилностима, мутације у генима за *Bax* протеине су веома честе (Miquel и сар., 2005). У дисрегулацији процеса апоптозе у ћелијама тумора, често је индикован протеин p53, који је поред улоге у иницијацији апоптозе, укључен у регулацију ћелијског циклуса, развојним процесима ткива, диференцијацији, амплификацији гена, рекомбинацијама ДНК, сегрегацији хромозома и ћелијском старењу, па се често назива чуварем генома. Дефекти у гену за овај тумор супресорски протеин индиковани су у преко 50% хуманих тумора (Vai и сар., 2006).



Слика 7. Механизми избегавања апоптозе у туморским ћелијама током туморогенезе (преузето из: Wong, 2011 и модификовано)

Један од механизма избегавања апоптозе код туморских ћелија је активација инхибитора апоптотских протеина (енгл. *Inhibitor of Apoptotic Proteins*, IAP). IAP су група структурно и функционално сличних протеина који регулишу апоптозу, цитокинезу и сигналну трансдукцију, а карактеришу се присуством BIR поновка (енгл. *Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat*), а до данас их је детектовано осам. Ови инхибитори апоптозе су ендогени блокатори каспаза који се везују за активно каспазно каталитичко место својим BIR доменом, што доводи до деградације активне каспазе или до немогућности везивања за супстрат (Wei и сар., 2008). Дерегулација IAP регистрована је у многим туморима. Студија Lopes и сарадника је показала поремећај у IAP експресији код тумора панкреаса, која је довела и до резистенције на хемиотерапију, при чему је најзначајнији члан cIAP-2. Код меланома и лимфома највише експримиран протеин је Livin, док је код глиома резистентних на хемиотерапију најзначајнији Apollon (Chen и сар., 1999; Lopes и сар., 2007).

Додатно, сама каспазна активност може да буде одлучујућа за исход апоптотског сигнала. Низак ниво каспаза у ћелији или дерегулација каспазне функције могу довести до смањења нивоа апоптозе током иницијације и прогресије тумора. Смањена експресија каспазе 9 је често присутна током друге фазе тумора дебелог црева и у корелацији је са лошим исходом болести (Shen и сар., 2010). У неким случајевима више од једне каспазе показује снижену експресију доприносећи расту и развоју тумора. Fong и сарадници су показали да је симултано снижење нивоа каспазе 8 и каспазе 10 укључено у патогенезу хориокарцинома (Fong и сар., 2006).



Рецептори смрти и њихови лиганди играју одлучујућу улогу у спољашњем путу апоптозе. Поред добро познатих представника суперфамилије TNF рецептора (енгл. *Tumor Necrosis Factor Receptor*), као што су TNFR1 и Fas рецептор, и други TNF рецептори укључујући DR3, DR4 (TRAIL-1), DR5 и DR6, ектодисплазин А рецептор (енгл. *Ectodysplasin A Receptor*, EDAR), као и рецептор за нервни фактор раста (енгл. *Nerve Growth Factor Receptor*, NGFR) могу да буду укључени у покретање процеса апоптозе. Сви наведени чланови поседују домене смрти што резултује активацијом низводне сигналне каскаде и активације процеса апоптозе (Lavrík и сар., 2005). Међутим, лиганди рецептора смрти такође се могу везати и за рецепторе који подсећају на функционалне рецепторе смрти (мамац рецептори) које понекад туморске ћелије могу да почну да експримирају у великом степену. Овакви рецептори у свом саставу не поседују секвенцу смрти што резултује у нефункционалном сигналном комплексу и немогућности инцијације апоптозе (Lavrík и сар., 2005). Снижен степен експресије рецептора и/или смањена концентрација лиганата смрти у туморском ткиву могући су механизми избегавања апоптозе у ћелијама тумора. Смањена експресија мембранских рецептора смрти и абнормална експресија нефункционалних рецептора играју значајну улогу у апоптотској резистенцији у различитим типовима тумора (Fulda, 2010).

Апоптоза представља моћан и важан ћелијски одбрамбени механизам против развоја тумора, јер ћелија активно учествује у аутодеструкцији. Зато се губитак осетљивости на апоптозу сматра једним од обележја тумора (Okada и Mak, 2004).

## 1.6. Регулација инфламације

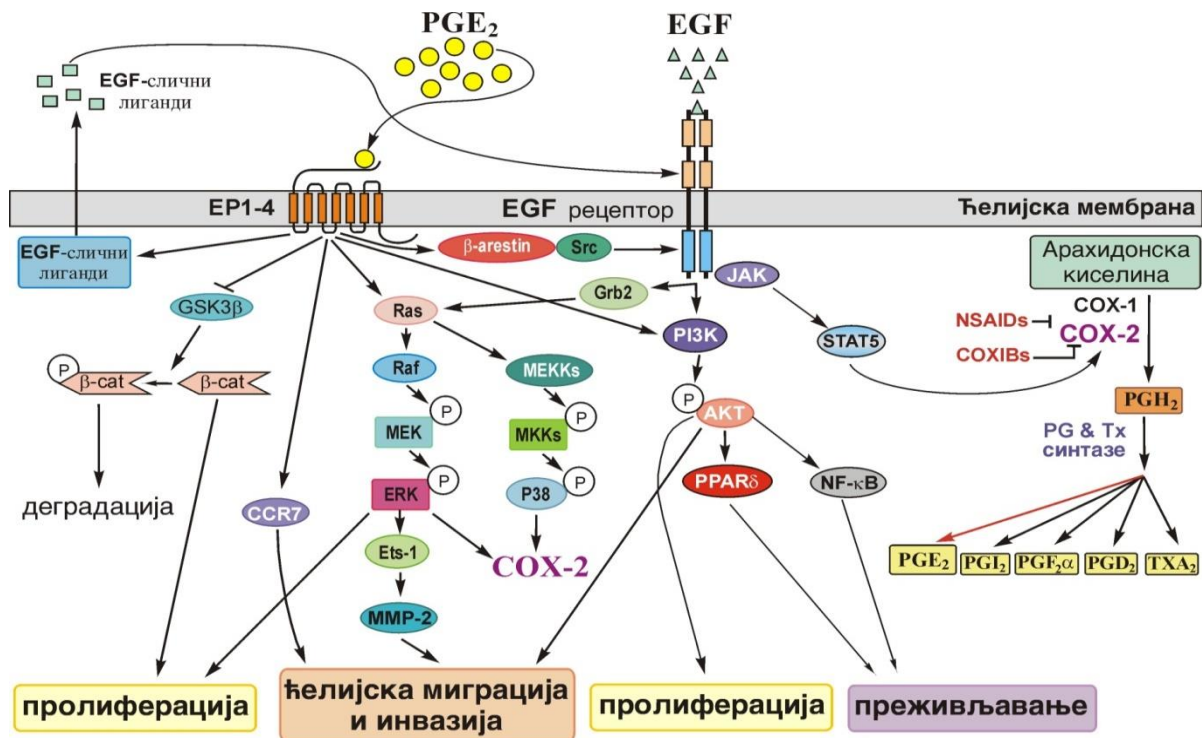
Циклооксигеназа (енгл. *Cyclooxygenase*, COX) је ензим који је одговоран за формирање важних биолошких медијатора, међу којима су простагландини, простациклини и тромбокساني. Простагландин E<sub>2</sub> (енгл. *Prostaglandin E<sub>2</sub>*, PGE<sub>2</sub>) је физиолошки најважнији простагландин који делује аутокринно и паракрино и регулише већи број физиолошких функција (Nakanishi и Rosenberg, 2013). Фармаколошка инхибиција COX-а доводи до смиривања клиничких симптома инфламације и осећаја бола. Нестероидни антиинфламаторни лекови (енгл. *Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs*, NSAID), попут аспирина и ибупрофена, делују путем инхибиције COX-а. COX конвертује арахидонску киселину до простагландина и овај ензим садржи два активна места. Тренутно су позната три COX изоензима: COX-1, COX-2 и COX-3 (Chandrasekharan и сар., 2002). Простагландини (енгл. *Prostaglandins*, PG) и тромбоксан настају разградњом арахидонске киселине услед деловања COX-1 и COX-2 и специфичних синтетаза, и делују аутокринно или паракрино путем мембранских рецептора повезаних са G протеинима. Биосинтеза PG је катализована COX-1 и COX-2 изоформама. Ови ензими показују много сличности у структури и каталитичким својствима и дају исти производ PGH<sub>2</sub>. COX-1 и COX-2 су различити у својој регулацији експресије, расподели у ткивима и припадајућим синтетазама, и на тај начин испуњавају различите биолошке функције. COX-1 је конститутивно експримиран у већини ткива и укључен је у одржавање хомеостазе у ткиву, док је експресија COX-2, индуцибилна изоформа, одговорна за појачану производњу простааноида као одговор на инфламаторне стимулусе и факторе раста током инфламације и разних патолошких стања, укључујући тумор, индукована различитим стимулусима, укључујући цитокине, митогене и хипоксију (Ricciotti и FitzGerald, 2011).

Нивои експресије COX-1 и COX-2 су ткивно специфични. Иако оба ензима делују на исти начин, селективна инхибиција може да произведе различите контраиндикације. COX-1 се сматра конститутивно активним ензимом, који се налази у већини ткива сисара, док с друге стране, COX-2 се не може детектовати у већини нормалних ткива (Kurumbail и сар.,

1996). COX-2 је индуцибилни ензим, који се појачано експримира у активираним макрофагама и другим ћелијама на месту инфламације, као и у разним туморима и сматра се да има значајну улогу у туморогенези (Telliez и сар., 2006).

Повећање нивоа експресије COX-2 се најчешће детектује и у премалигном и у малигном ткиву. Његова прекомерна експресија је последица поремећаја у транскрипционој и посттранскрипционој контроли. Фактори раста, цитокини, онкогени и туморски промотори стимулишу COX-2 транскрипцију преко сигналног пута Ras протеина и протеин киназе C (енгл. *Protein kinase C*, PKC) (Слика 8) (Wang и сар., 2011).

На пример, прекомерна експресија COX-2 је забележена у HER2/neu ћелијама тумора дојке, као последица повећане Ras сигнализације (Subbaramaiah и сар., 2002). У зависности од врсте стимулуса и типа ћелије, различити транскрипциони фактори, укључујући активирајући протеин-1 (енгл. *Activator Protein 1*, AP-1), нуклеарни фактор κB (енгл. *Nuclear Factor-κB*, NF-κB), нуклеарни фактор активираних Т-ћелија (енгл. *Nuclear Factor of Activated T-cells*, NFAT) и PEA3 (енгл. *Polyoma Enhancer Activator 3*), могу да стимулишу транскрипцију COX-2. Са друге стране, wild-типе, али не и мутирани p53 може да инхибира транскрипцију COX-2. У складу са оваквим открићем, повећани нивои COX-2 су откривени у епителним туморима који су експримирали мутирани p53 (Ristimaki и сар., 2002). Као и p53, статус APC тумор супресор гена може бити детерминанта експресије COX-2 (Araki и сар., 2003). Сва наведена сазнања сугеришу да је ниво експресије COX-2 у туморима одређен односом између активације онкогена и инактивације тумор супресор гена.



Слика 8. Сигнална каскада покренута активацијом рецептора за EGF (EGFR) који стимулише транскрипцију COX-2 гена у туморским ћелијама (преузето из: Wang и сар., 2011 и модификовано)

Прекомерна експресија COX-2 може да буде и резултат поремећаја на нивоу транслације. Дефицит у везивању TIA-1 за иРНК уочен је у ћелијама тумора дебелог црева, што у овим ћелијама доводи до прекомерне експресије COX-2 (Dixon и сар., 2003). Промене

у релативној заступљености или везивној активности ових функционално хетерогених ARE (енгл. *Adenylate-uridylate-rich elements*, AREs) везујућих протеина, вероватно утичу на нивое COX-2 у туморима.

Степен прекомерне експресије COX-2 варира у зависности од врсте тумора, услед њихових унутрашњих биолошких разлика. Такође, конвенционална антитуморска терапија, радијација и хемиотерапија, могу довести до повећане биосинтезе COX-2 и PG-a (Chou и Milas, 2003; Subbaramaih и сар., 2003), што може да има потенцијалне терапеутске импликације.

Као што је већ поменуто, COX-2 индуковани простагландини показују више протуморских ефеката. Стога је разуман постулат да селективна инхибиција COX-2 може довести до инхибиције туморогенезе. Да би се истражила ова могућност, спроводе се бројне студије на туморским ћелијама гајеним у *in vitro* условима и на експерименталним животињама и ове фармаколошке студије сугеришу да је COX-2 *bona fide* терапеутски циљ у превенцији и лечењу тумора (Greenhough и сар., 2009; Dore, 2011).

### 1.6.1. Улога циклооксигеназа у регулацији процеса апоптозе

Смањен ниво апоптозе или резистенција ћелија на програмирану ћелијску смрт има виталну улогу у туморогенези. Механизми којима ћелија потенцијално може да избегне апоптозу укључују: поремећај равнотеже проапоптотских и антиапоптотских протеина, смањену активност каспаза и измењену сигнализацију посредовану рецепторима смрти (Wong, 2011). Керг и сарадници су у својим истраживањима дошли до закључка да постоји значајна повезаност између апоптозе и елиминације туморских ћелија, хиперплазије и прогресије тумора (Kerr и сар., 1972).

Сузбијање апоптозе током туморогенезе игра централну улогу у развоју неких врста тумора. Постоји низ молекуларних механизма које ћелије тумора користе за сузбијање апоптозе. Промене у пролиферацији и поремећен ниво апоптозе имају значајну улогу у патогенези тумора. Туморске ћелије имају способност преживљавања и поред акумулираних оштећења ДНК и то је једна од најважнијих њихових карактеристика. Док здраве ћелије имају способност препознавања и брзог поправљања оштећених места на ДНК, а активацијом апоптозе спречавају деобу ћелије и умножавање мутираних ћерки ћелија. Накупљање мутираних ћелија може бити последица активације онкогена, инактивације тумор супресор гена, мутације гена који регулишу апоптозу или су укључени у процесе репарације ДНК молекула (Shukla и сар., 2014).

Хронична инфламација је значајан фактор ризика за настанак тумора, а прецизан механизам индукције се још увек истражује (Wiese и сар., 2001). Аберантно повећана експресија COX-1 и COX-2 повезује се са малигном трансформацијом здравог ткива, пролиферацијом и повећаним инвазивним потенцијалом туморских ћелија и неповољним клиничким исходом (Pang и сар., 2016). COX ензим је неправилно регулисан у ћелијама тумора, а досадашња истраживања упућују на велики значај метаболичког пута који укључује изоформе COX ензима у туморогенези и прогресији тумора (Fosslien, 2001).

COX-1 је појачано експримирана у ћелијама тумора цервикса и оваријума (Fürstenberger и сар., 2006), док се COX-2 у здравом ткиву обично не детектују за разлику од значајно повишених нивоа код тумора дебелог црева, плућа (Sung и сар., 2011), простате



(Kim и сар., 2011), цервикса (Kulkarni и сар., 2001) и дојке (Nie, 2007). Појачана COX-2 активација удружена са повећаним малигним потенцијалом у основи је резултат активације транскрипционог фактора NF-κB (Којима и сар., 2004). NF-κB, у условима хроничне инфламације, индукује експресију фактора раста и ангиогенетских фактора удружених са индукцијом и прогресијом тумора (Dooher, 2011). Повишени нивои информационе РНК за COX-2 и COX-2 протеин доказани су у великом броју случајева тумора дебелог црева (Fournier и Gordon, 2000).

Ангиогенеза је процес стимулисан простагландином E2 и COX-2 појачаном продукцијом VEGF, који последично због појачане синтезе потенцира и развој метастаза. Као активатор ангиогенезе делује и тромбоксан A2 који је производ еикосаноида, а чију продукцију могу да инхибирају COX-2 антагонисти. Повећана продукција MMP и смањена експресија ткивног инхибитора металопротеиназа су индикатори инвазивности тумора. Још једна улога COX-2 у туморогенези огледа се у улози разградње арахидонске киселине. Фосфолипаза A2 производи слободну арахидонску киселину, коју COX-2 преводи у простагландине, липооксигеназа (LOX) у леукотријене, а ензим FACL4 (енгл. *Fatty Acid CoA Ligase 4*) је коњугује помоћу коензима A (Taketo и Sonoshita, 2002).

Потенцирање апоптозе доприноси антитуморској активности хемиотерапеутика, што нас упућује на потенцијални пут развоја резистенције на лек. Туморска ћелија је приморана да издржи велики број структурних и метаболичких промена. Да би даље напредовала она мора бити спремна да избегне или заобиђе имунски одговор домаћина. Измењена експресија протеина који учествују у процесу програмиране ћелијске смрти може омогућити ћелијама тумора да преживе или да развију резистенцију на примењени хемиотерапеутик (Johnstone и сар., 2002).

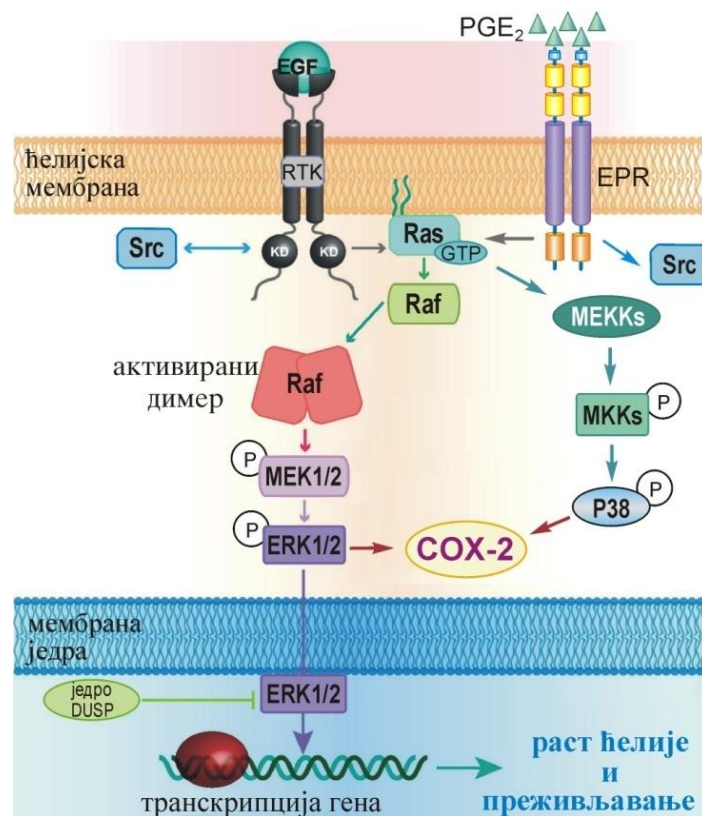
Продукти ових сигналних молекула су регулисани степеном експресије COX-2 као и каталитичким капацитетом обе циклооксигеназне изоформе (Kulmacz, 1998). Обе изоформе имају компарабилне Km вредности за арахидонате, али се COX-2 активира при много мањим концентрацијама него COX-1 (Smith и Song, 2002). Неселективни NSAID инхибирају обе циклооксигеназне форме, COX-1 путем процеса иререверзибилне ацетилације и COX-2 процесом компетитивне инхибиције. *In vitro* есеји показују да постоји широк ранг у селективности NSAID према циклоксигеназним формама где поједини чланови показују висок степен селективности COX-1 (ибупрофен, флурбипрофен), док коксими показују висок степен селективности према COX-2 изоформи (Tanaka и сар., 2002; Zarghi и Arfaei, 2011).

Вишестепена природа настанка неоплазије дебелог црева упућује на чињеницу да специфични приступи могу имати важну улогу у развоју и инвазији ових тумора. Неколико важних фактора је у вези са патогенезом и развојем тумора дебелог црева укључујући: измењену активност NF-κB, измењену експресију COX-1 и COX-2 као и промене у односима проапоптотских и антиапоптотских протеина. Истраживања на нивоу клиничке онкологије и фармакологије теже да открију нове агенсе, природне или синтетске, који би свој потенцијални механизам деловања остваривали путем инхибиције неког од поменутих молекуларних механизма (Temraz и сар., 2013).

Досадашња истраживања упућују да су антиинфламаторни ефекти и антитуморски потенцијал неких NSAID често последица селективне инхибиције COX-2 изоформе док су нежељена дејства ове групе лекова повезана са степеном експресије конститутивне COX-1 изоформе (Hinz и Brune, 2002).

Ограничена метаболичка конверзија арахидонске киселине до простагландина у различитим патолошким процесима катализује се преко COX-1 и COX-2. PGE<sub>2</sub> је медијатор проинфламаторних и тумор промовишућих ефеката COX ензима и захтева посебну пажњу. Показано је да 15-простагландин дехидрогеназа (15-PGDH) учествује у каталитичкој деградацији PGE<sub>2</sub> (Shoji и сар., 2004). NSAID доводе до инхибиције COX ензима, утичу на метаболизам простагландина, и све то резултује антиинфламаторним и антитуморским ефектом ових лекова.

Сигнални пут митогеном активираних протеин киназа (енгл. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) укључује многе мале GTP везујуће протеине као што су Ras, Raf, MEK (енгл. *Mitogen-activated protein kinase kinase*) протеини и екстрацелуларним сигнаlima регулисана киназа (енгл. *Extracellular signal-regulated kinases*, ERK) (Слика 9). Пренос сигнала посредством MAPK сигналног пута отпочиње везивањем сигналних молекула (лиганда) за одговарајуће мембранске рецепторе тирозин киназа (енгл. *Receptor Tyrosine Kinases*, RTK) и завршава се синтезом протеина који промовишу раст, пролиферацију и преживљавање ћелије.



Слика 9. MAPK сигнални пут

(преузето са сајта: <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/map-kinase-signaling> и модификовано)

COX-2 игра кључну улогу у настанку тумора дебелог црева активацијом PGE<sub>2</sub> експресије путем различитих рецептора (EPR (енгл. *E Prostanoid Receptors*) или PPAR (енгл. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) рецептори) или других сигналних путева (NF-κB, ERK) који изазивају прекомерну пролиферацију и преживљавање ћелија или генетске мутације. Предложени механизми могу допринети развоју нових лекова који ће имати значајну улогу у превенцији и контроли тумора дебелог црева.

## 1.7. Инвазија и метастаза

### 1.7.1. Принципи ћелијске покретљивости

Миграција ћелија је од суштинске важности за успостављање и одржавање одговарајуће организације организама. Представља физиолошки механизам одржавања ткивне хомеостазе, и репарације којом се ћелија адаптира на различите услове током свог живота. У организму, миграција ћелија је од суштинског значаја за правилан имунски одговор, зарастање рана и хомеостазу ткива, док је аберантна миграција ћелија утврђена у различитим патолошким стањима. Сама миграција може спречити ширење високо малигних туморских ћелија, успорити инвазију ћелија током инфламације или појачаног зарастања рана (Treat и сар., 2012). Међутим, миграција ћелија тумора представља најзначајнији проблем у целом процесу туморогенезе и клиничком третману (Friedl и Wolf, 2010). Како је миграција ћелија широк појам, инвазија ћелија је процес специфичан искључиво за ћелије тумора током њиховог продирања кроз базалну мембрану и екстрацелуларни матрикс у околна ткива. Инвазивност различитих ћелија тумора је различита и може се квантификовати инвазивним потенцијалом ћелија (Clark и Матић Vignjević, 2015). Поред круцијалне улоге у репарацији ткива, улога миграције је у настанку тумора (Sahai, 2005; Christiansen и Rajasekaran, 2006; Friedl и Gilmour, 2009).

Инвазивне ћелије поседују тзв. инвазивни фенотип условљен реверзибилним променама компоненти цитоскелета и ослабљеним међућелијским везама. Инвазивне ћелије тумора појачано експримирају протеолитичке ензиме и ММП које разграђују екстрацелуларни матрикс и олакшавају њихову миграцију у околна ткива (Mattila и Lappalainen, 2008; Friedl и Wolf, 2010; Weinberg, 2014). Способност ћелија тумора да се шире од првобитне локације до удаљених локација у организму јесте основна карактеристика која разликује бенигне од малигних тумора.

Главни узрок смрти код тумора је метастазирање сходно томе да инвазивне ћелије које се инфилтрирају у удаљена ткива и стичу особине које их чине отпорнијим на деловање механизма имунског система (Vinogradov и Wei, 2012), те формирају секундарне туморе. Клинички исход је често у корелацији са анатомском класификацијом опсега тумора и детекција удаљеног ширења и метастазирања је лош индикатор за пацијента (Martin и сар., 2013; Weinberg, 2014). Локални инвазивни тумор се не класификује као метастатски и третира се коришћењем истих протокола као код неметастатских, локализованих лезија (Zhang и сар., 2012).

Метастатске болести су последња фаза ширења тумора. Сматра се да терминално трансформисане ћелије тумора стичу капацитет да постану независне од ткива њиховог примарног порекла, да нападну друге органе, да путују крвотоком и да формирају колоније. Тако у датом тумору може да постоји и неколико линија развоја ћелија тумора, које су способне да се самостално обнове, еволуирају у различите типове и фенотипове у зависности од интеракције са околином, доприносећи растућој локалној маси тумора (Liu и сар., 2007). Метастатске ћелије могу развити различите облике и улоге, пролазећи кроз морфолошки прелазне облике који им омогућавају да савладају препреке и нападају друге органе (Brabletz и сар., 2005). Из тога следи да се метастатске ћелије могу јавити чак и у веома малим, по свему судећи раним лезијама тумора. Код ових пацијената, примарни тумор може бити толико мали да није клинички детектабилан, а више од 10% пацијената може имати метастазе без идентификације примарног тумора (Freudenberg и сар., 2009).

## 1.8. Оксидативни и антиоксидативни метаболизам

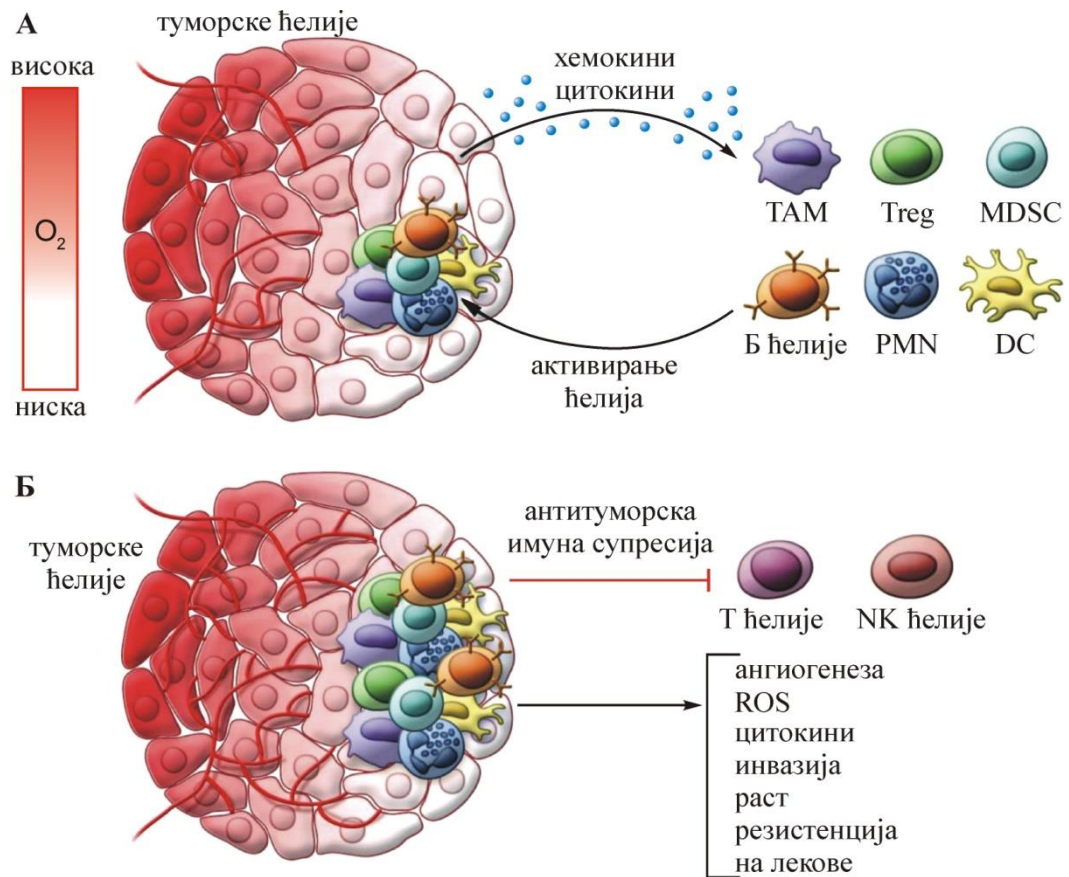
### 1.8.1. Улога реактивних молекула у туморогенези

Реактивни молекули имају бројне корисне улоге у умереним концентрацијама у физиолошким условима када и посредују у великом броју процеса. Главни су медијатори интрацелуларних сигналних каскада и регулације генске експресије, а регулишу и ћелијски циклус и апоптозу, контролишу активацију имунског система и учествују у одбрани од инфективних агенаса (Sena и Chandel, 2012).

Реактивне врсте кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) имају важну улогу у трансдукцији сигнала у физиолошким и патофизиолошким условима. Ензими и субћелијски делови који производе ROS, повезани су са метабличком регулацијом, а болести повезане са метаболичком дисфункцијом могу утицати на промене у редокс равнотежи. ROS регулишу ћелијску хомеостазу и главни су модулатори ћелијске дисфункције доприносећи патофизиологији болести. Додатно, ROS су и нуспродукти бројних ензимских реакција у различитим деловима ћелије и чине део основне метаболичке функције. У зависности од извора ROS-а, врсте ћелија и ткивног окружења, ROS сигнализација може учествовати у нормалним физиолошким процесима или допринети неадекватном одговору који доводи до поремећаја метаболизма и инфламације (Steven и сар., 2018).

Еволуцијом аеробног метаболизма, организми су изложени сталним, потенцијално опасним оксидативним процесима посредованим ROS-ом. До појачане продукције ROS-а најчешће доводе фактори из спољашње средине (јонизујуће зрачење, токсини, лекови, хемикалије, полутанти) (Droge, 2002). Свака ћелија организма производи ROS у одређеном степену док су неке ћелије специјализоване за њихову обимну синтезу, односно долази до тзв. „оксидационог праска“ (енгл. *oxidative burst*) у одговарајућим физиолошким ситуацијама (Sies, 1991).

Продукција ROS је условила развој одбрамбених механизма организма који укључује систем антиоксидативне заштитне (енгл. *Antioxidative Defence System*, AOS). Током година се формирао јасан поглед на ROS и читав редокс систем као базу физиолошких процеса организма (ћелијска пролиферација и диференцијација, пренос сигнала, регулација метаболизма и међућелијска комуникација), (Schafer и Buettner, 2001; Cooper и сар., 2002), цитопротективних механизма (инфламација, одбрана од микроорганизама), (Baggiolini и Thelen, 1991; Sallusto и Baggiolini, 2008), али и патофизиолошких феномена (старење, туморогенеза, апоптоза, некроза, ефективно и токсично деловање лекова) (Žikić и сар., 2000; Droge, 2002; Triner и Shah, 2016) (Слика 10).



**Слика 10.** Механизам деловања хипоксије у туморском ткиву (преузето из: Triner и Shah, 2016 и модификовано)

TAM (енгл. *Tumor-Associated Macrophages*) - макрофаги; Treg - регулаторне Т ћелије; MDSC (енгл. *Myeloid Derived Suppressor Cells*) - имуносупресорске мијелоидне ћелије; PMN (енгл. *Polymorphonuclear Neutrophils*) - неутрофили; DC- дендритске ћелије.

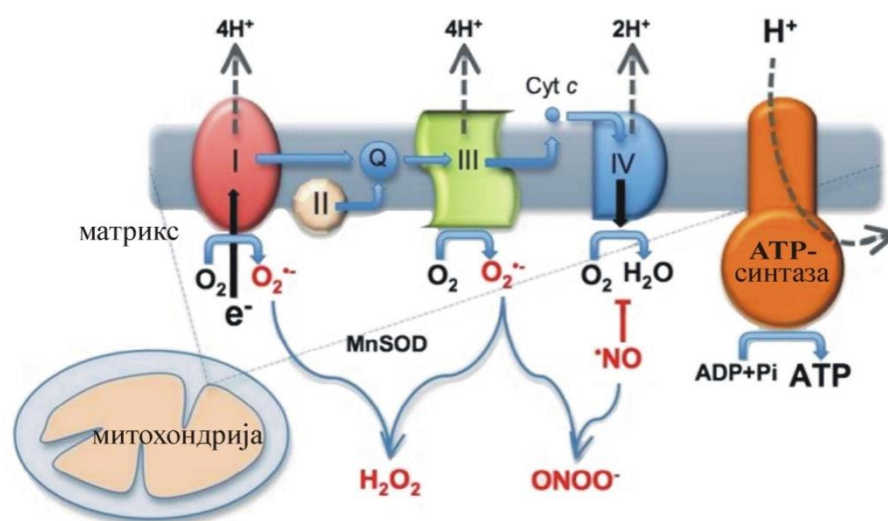
Оксидативни стрес се дефинише као поремећај равнотеже прооксидативних и антиоксидативних механизма при чему се фаворизују прооксидативни механизми водећи потенцијалним оштећењима ћелија (Sies, 1991). Ради се о врло нарушеном балансу између продукције ROS и реактивних врста азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) са једне стране и антиоксидативне заштите са друге стране (Halliwell и Gutteridge, 2007).

Услед смањене антиоксидативне активности ћелије или због повећане производње реактивних молекула долази до поремећаја у равнотежи између продукције реактивних врста (ROS и RNS) и активности система антиоксидативне заштите што води настанку различитих оштећења ћелије, убрзава се процес старења, индукује се низ патолошких стања, укључујући и туморогенезу, а у крајњем случају долази и до смрти организма.

Поред значајних физиолошких улога које остварују, реактивни молекули су и узрочници различитих дисфункција ћелије и представљају основу патогенезе великог броја поремећаја (Halliwell и Gutteridge, 2007). Током реакције са молекулима у ћелији ROS и RNS индукују продукцију секундарних и терцијарних реактивних молекула способних да наруше хемијске везе и доведу до оштећења великог броја молекула у ћелији укључујући липиде, протеине, угљене хидрате и нуклеинске киселине (Halliwell и Gutteridge, 2007; Liou и Storz, 2010).

### 1.8.2. Реактивне врсте кисеоника

ROS се нормално продукују у току физиолошких процеса у ћелији, деловањем различитих ензимских и неензимских система смештених на ћелијским мембранама, у цитоплазми, плазма мембрани и крвним ћелијским елементима. Главни извор ROS у ћелијама су митохондрије (Слика 11), али и пероксисоми, микросоми, ћелијске мембране, ензими везани за мембрану (циклооксигеназе и липооксигеназе) (Droge, 2002; Bolaños и сар., 2009). Ћелије које су укључене у примарну и секундарну одбрану организма од микроорганизама и опасних молекула продукују велике количине ROS, чије се деловање налази у основи њихове цитотоксичности (Droge, 2002).



Слика 11. Респираторни електрон-транспортни ланац и стварање ROS и RNS у митохондријама (преузето из: Bolaños и сар., 2009 и модификовано)

Комплекс I – NADH-Q-редуктаза; Комплекс II – Сукцинат-Q-редуктаза;  
Комплекс III – QH<sub>2</sub>-Cyt C-редуктаза; Комплекс IV – Cyt C-оксидаза.

Супероксид анјон радикал кисеоника ( $O_2^{\cdot-}$ ) углавном се продукује у респираторном ланцу митохондрија, и може да се конвертује до водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) деловањем супероксид-дисмутазе (MnSOD), или може да реагује са азот оксидом (NO) формирајући пероксинитрит ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Добро су проучени ефекти радијације (Turrell, 1991), полутаната у ваздуху (Hippeli и Elstner, 1991), тешких метала (Žikić и сар., 2000; Ognjanović и сар., 2003), као и ефекти метаболизма неких лекова (Akagah и сар., 2008; Darwich и сар., 2012) на продукцију ROS. Данас је јасно да су ROS битни учесници у етиологији различитих патофизиолошких феномена, као што су исхемијско-реперфузиона оштећења органа, неуродегенеративне болести, артеросклероза, старење, туморогенеза, програмирана ћелијска смрт (апоптоза) и некроза, ефективно и токсично деловање лекова (Schafer и Buettner, 2001; Droge, 2002; Matic и сар., 2017).

Патофизиолошки ефекти су удружени са токсичним деловањима ROS, која воде оксидативним оштећењима ћелије. Према Dargel-у постоје три механизма настанка ових оштећења: 1) интеракције ROS и биолошких структура, при чему настају ковалентне модификације макромолекула (првенствено протеина и нуклеинских киселина); 2) промене настале као последица разарања мембранских липида у процесу липидне пероксидације; и 3) формирање нерадикалских продуката који специфично нападају различите циљеве у ћелији



(Dargel, 1991). Оксидативна оштећења молекула нуклеинских киселина имају за последицу поремећену ДНК репликацију, транскрипцију и транслацију, праћену мутацијама, старењем и смрти ћелије (Kasai и Nishimura, 1991), док оксидативна деструкција угљених хидрата ремети њихову функцију.

Оксидација тиолних (-SH) група протеина доводи до промене структуре и функције ензима, поремећаја трансмембранског транспорта јона и контактилних особина ћелије, као и модификације рецептора (Kamata и Hirata, 1999; Droge, 2002). У интеракцијама ROS и макромолекула у организму могу да настану и органски радикали. Један од механизма је процес липидне пероксидације, који укључује стварање липидних пероксил-радикала (ROO $\cdot$ ) и липидних хидропероксида (ROOH), (Halliwell, 1995). Као последица липидне пероксидације у ћелији долази до деградације липидних мембрана, интеракције деградационих производа и различитих циљева у ћелији и изван ње, као и продукције нових количина ROS (Dargel, 1991).

Оксидативни стрес узрокује оштећење ткива као пратећа појава зрачења и хипоксије. Све то је последица нормалног ћелијског метаболизма, али исто тако може бити и последица егзогених фактора, било да су то хемијски утицаји канцерогених једињења, било физички утицаји, нпр. јонизујуће зрачење. Оштећење ДНК узроковано деловањем ROS је најчешћи начин оштећења примећен у аеробним ћелијама. Када се овај начин оштећења ДНК јави у ћелијама, могу настати бројне структурне промене, укључујући лезије компоненти од којих се састоји ДНК, као и фрагментације суперспирале ДНК и стварање патолошких веза (Marnett, 2000).

Супероксид анјон радикал (O $_2^{\cdot-}$ ) настаје једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника. Ова реактивна врста настаје у скоро свим аеробним ћелијама, прво у респираторном ланцу митохондрија и хлоропласта, као и у ER (Halliwell и Gutteridge, 1999). Извор O $_2^{\cdot-}$  су биолошке оксидације посебно оне које катализују NAD(P)H-оксидазе (у неутрофилима, еозинофилима, моноцитима, макрофагима и једрима туморских ћелија), ксантин-оксидазе, 5-липооксигеназе, циклооксигеназе (Droge, 2002). У реакцијама хидроксилаза, у присуству прелазних метала, у процесима фагоцитозе и липидне пероксидације, деловањем различитих цитостатика, зрачења, биотрансформацијом егзогених и ендогених супстрата у ER, метаболизмом етанола, такође настају значајне количине O $_2^{\cdot-}$  (Droge, 2002).

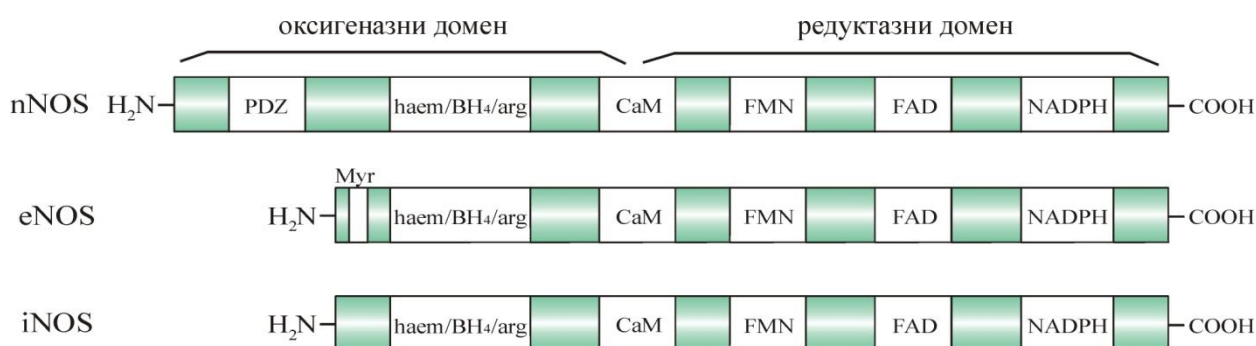
Супероксид анјон радикал у физиолошким концентрацијама функционише као регулатор низа физиолошких процеса - продукција еритропоетина, релаксација глатких мишића, сигнална трансдукција путем мембранских рецептора, стимулација имунских функција (Droge, 2002). Док се штетни ефекти O $_2^{\cdot-}$  на ћелију рефлектују као деполимеризација полисахарида, оштећење ензима и ћелијских мембрана, ремећење синтезе ДНК и транскрипције у РНК, што може довести до инактивације вируса, уништавања бактерија, али и до процеса туморогенезе (Droge, 2002).

NADPH оксидаза је протеински комплекс везан за мембрану, сачињен од бројних мембранских и цитосолних субјединица. Централни ензим чини пет субјединица p22 и gp91 који формирају хетеродимерни флавохемопротеин познат као цитохром b<sub>558</sub> и мембрански су протеини, и p40<sup>PHOX</sup>, p47<sup>PHOX</sup> и p67<sup>PHOX</sup> који чине цитосолну фракцију комплекса. Када се ћелија активира, цитосолна фракција оксидазе се фосфорилише и придружује цитохрому b<sub>558</sub>, као и регулаторни протеини, и формира се активна NADPH оксидаза, која редукује кисеоник до супероксида, користећи NADPH као донор електрона. Активирана NADPH

оксидаза ослобађа супероксид (који се трансформише у водоник пероксид и хидроксилни радикал) у фагозому, како би се уништила фагоцитована честица али и заштитило околно ткиво од оштећења, где до ослобађања радикала долази тек касније (Park, 2003).

### 1.8.3. Реактивне врсте азота

Због различитих физиолошких функција и опште распрострањености, NO је од изузетне биолошке важности и предмет интензивног интересовања научника последњих деценија. Макрофаги и ћелије ендотела крвних судова су прве ћелије у којима је показана синтеза NO под деловањем азот оксид синтетазе (енгл. *Nitric Oxide Synthase*, NOS) (Furchgott и Zawadzki, 1980; Hibbs и сар., 1987). Хумани и мишији геном садрже три различита гена (Слика 12) који кодирају NO синтазу: 1) ген за неуралну NOS (*nNOS*); 2) ген за индуцибилну NOS (*iNOS*) и 3) ген за ендотелну NOS (*eNOS*). Ендогено синтетисани NO има значајну улогу у регулацији многих физиолошких процеса. Промењена функција NO, изазвана променама у продукцији или активности, је повезана са низом обољења као што су атеросклероза, хипертензија, дијабетес, хиперлипидемија, тумор, артритис, али и многа неуролошка обољења (мигрена, епилепсија, мождани удар, Паркинсонова и Алцхајмерова болест) (Schmidt и Walter, 1994; Moncada и Higgs, 1995; Zawia и сар., 2009).



**Слика 12.** Структура NOS изоформи  
(преузето из: Alderton и сар., 2001 и модификовано)

Индукцибилна NOS (*iNOS*) у макрофагима продукује велике количине NO у имунским реакцијама током одбране домаћина и у овако великим количинама, NO убија суседне ћелије, које могу бити различите врсте патогена (бактерије, гљиве и паразити), вируси, туморске ћелије, а може учествовати и у оштећењу нормалних ћелија домаћина у аутоимунским болестима (Moncada и сар., 1997). Механизам NO-посредоване цитотоксичности обухвата инхибицију АТФ продукције и инхибицију ДНК синтезе (Schmidt и Walter, 1994; Moncada и Higgs, 1995; Moncada и сар., 1997).

Продукција NO обезбеђује макрофагима цитостатичку и цитотоксичну активност против вируса, бактерија, гљивица, протозоа, паразитских црва и туморских ћелија. Прекомерна продукција NO је високо токсична за све ћелије. Цитотоксични ефекти NO посредовани су пре оксидативним продукцијом које генерише, односно његовом директном брзом интеракцијом са молекулским кисеоником и ROS. NO се оксидује до нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) који се користе и као његови биоиндикатори, а у реакцији са супероксид анјон радикалом ( $\text{O}_2^-$ ) формира се веома агресивни пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) (Pacher и сар., 2007).



RNS могу да оксидују, нитрирају и нитрозилију већи број молекула и тиме доведу до њихове дисфункције. Повећана продукција NO представља основу за патогенезу читавог низа поремећаја као што су неуродегенеративне болести, болести кардиоваскуларног система, хронична запаљења и туморогенеза (Štajn и сар., 2007).

#### ***1.8.4. Систем заштите од оксидативних оштећења***

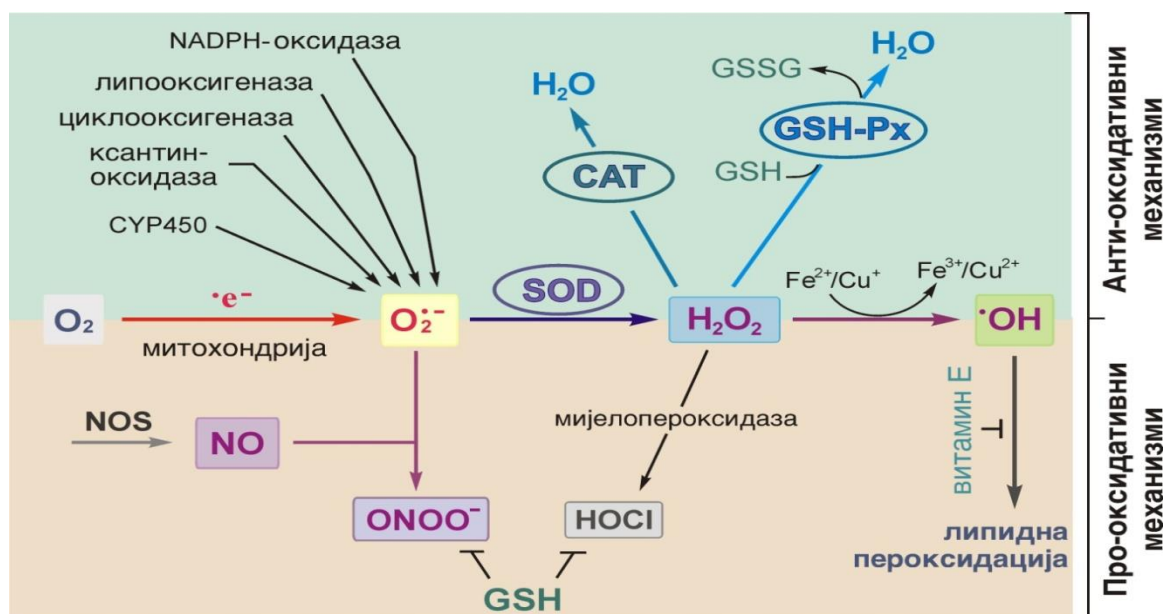
Током еволуције је развијен систем заштите од оксидативних оштећења AOS код свих аеробних организама како би се спречили прекомерни штетни ефекти изазвани метаболички генерисаним реактивним врстама. Ћелије се штите од токсичног деловања реактивних молекула бројним ендогеним структурама које „хватају“ слободне радикале укључујући непротеинске молекуле, протеине, као и каталитичке ензиме. На основу природе и начина деловања постоје примарне и секундарне компоненте AOS заштите. Примарна антиоксидативна заштита обухвата ензимске и неензимске компоненте, које су активне у условима нормалне и повећане продукције ROS. У секундарну антиоксидативну заштиту спадају протеин-специфичне оксидоредуктазе (протеин-ADP-рибозил-трансфераза, тиол-трансфераза и АТР и  $\text{Ca}^{2+}$  независна протеаза) које ефикасно репарирају оштећења ћелијских молекула (Štajn и сар., 2007).

##### *1.8.4.1. Глутатион - главна неензимска компонента система антиоксидативне заштите*

Глутатион је трипептид који је широко присутан у свим ћелијама и то у два облика: редуковани (GSH) и дисулфид оксидовани облик (GSSG) и однос оксидованог и редукованог глутатиона је најбољи показатељ оксидативног стреса у ћелији. GSH је антиоксидативни молекул и спречава оштећења ћелијских компоненти која могу да узрокују реактивне врсте кисеоника попут слободних радикала и пероксида (Pompeo и сар., 2003). Више од 98% интрацелуларног глутатиона се налази у редукованом стању (GSH) при физиолошким условима, а остатак је у форми дисулфида – GSSG, мешаних дисулфида (углавном GSS-протеин) и тиоестара. Унутарћелијски однос његове редуковане и оксидоване форме зависи од баланса између његовог коришћења и синтезе, а здравим ћелијама заступљеност дисулфидне форме ретко достиже 10% (Lu, 2009).

Глутатион има велики број значајних улога у ћелији као што су антиоксидативна заштита, учествује у метаболизму простагландина, у регулацији ћелијског циклуса и генској експресији (Aquilano и сар., 2014). Глутатион штити ћелије од апоптозе интеракцијом са антиапоптотским сигналним путевима и регулише неке факторе транскрипције (Birben и сар., 2012).

Антиоксидативни ефекат глутатиона базиран је на способности сулфхидрилне групе цистеина да се реверзибилно оксидује, при чему врши директну неутрализацију реактивних врста,  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$  и  $\text{ONOO}^-$ , као и органских радикала ( $\text{R}\cdot$ ). Ензим GSH-Px користи глутатион као супстрат редукујући водоник пероксид и хидропероксид, а са ензимом GST глутатион као коњугујући молекул учествује у детоксификацији и екскрецији ксенобиотика (Aquilano и сар., 2014). Глутатион може неензимски да ствара комплексе са металима, због чега се сматра важном компонентом у процесима транспорта, депоновања и метаболизма метала, а може да функционише и као редуктант или кофактор у различитим редокс реакцијама које захтевају јоне метала (Ballatori, 1994).



Слика 13. Продукција реактивних молекула и механизми антиоксидативне заштите у ћелији  
(преузето из: Jaeschke и сар., 2012 и модификовано)

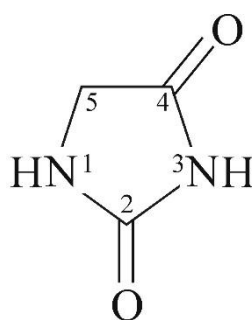
Повишен број реактивних молекула откривен је код скоро свих тумора, где они промовишу многе аспекте развоја и раста тумора. Међутим, туморске ћелије изразито повећавају експресију нивоа антиоксидативних протеина приликом детоксикације од реактивних врста. На **Слици 13** схематски су приказани ћелијски механизми продукције реактивних молекула, као и механизми деловања система антиоксидативне заштите који омогућавају функционисање ћелијских система приликом константне продукције реактивних врста, као и да неутралишу прекомерну продукцију ових молекула или да изврше репарацију насталих оштећења. Локална концентрација, као и сама локација стварања реактивних врста од изузетне су важности за функционисање реактивних врста у туморима. Изазов за нове терапеутске стратегије јесте регулисање унутарћелијске сигнализације реактивних врста и преусмеравање равнотеже ка апоптотској сигнализацији изазваној реактивним врстама. Главне сигналне каскаде које користе реактивне врсте пружају могућност модулације у терапији.

Глутатион редукује дисулфидне везе формиране унутар цитоплазматских протеина до цистеина делујући као довор електрона. Однос редукованог и оксидованог глутатиона унутар ћелије (тзв. глутатионски редокс пар, GSSG/2GSH) се често користи као мера ћелијске токсичности (Pastore и сар., 2001). Значајну улогу у одржавању редокс средине у ћелији имају бројни протеини који садрже сулфхидрилне групе, а налазе се у облику тиола, дисулфида или мешовитих дисулфида (Schafer и Buettner, 2001). Протеинске С-тиолације/детиолације су динамички процеси који се јављају у физиолошким условима, али и у условима оксидативног стреса и значајан су чинилац регулације пролиферације и диференцијације ћелија, програмиране ћелијске смрти (апоптозе) и некрозе ћелија, туморогенезе (Schafer и Buettner, 2001). Ови процеси подразумевају веома прецизну регулацију посредовану променама у редукционом потенцијалу редокс парова при чему долази до активације серије „нано-прекидача“ (енгл. *Nano-Switches*) који су контролисани у знатној мери редукованим глутатионом (Schafer и Buettner, 2001; Cooper и сар., 2002).

Глутатион реагује брзо тако што хвата ROS и RNS (Kalyanaraman и сар., 1996) и учествује у редукцији токоферол радикала директно или индиректно редукујући семидехидроксиаскорбат радикал и на тај начин спречава процес липидне пероксидације (Chan и сар., 1999). У реакцијама катализованим глутатион-пероксидазом и глутатион-S-трансферазом GSH као кофактор учествује у редукционој детоксификацији водоничних и органских (липидних) пероксида (Mates, 2000). Свака од ових реакција директно или индиректно резултује стварањем оксидованог облика глутатиона који се у ћелији редукује у GSH помоћу глутатион-редуктазе у NADPH-зависној реакцији (Mates, 2000).

## 1.9. Хидантоини

Хидантоин је опште прихваћен назив за имидазолидин-2,4-дионе (Слика 14). Алантоин, као један од важнијих деривата хидантоина, јавља се у природи, појављује се као производ метаболичких процеса у урину животиња.



Слика 14. Структура хидантоина

Хидантоин је први синтетисао Вауер 1821. године, мада његова структура није била утврђена све до 1870. године. Од тада је синтетисан велики број деривата хидантоина од којих је неколико 5,5-дисулфитисаних деривата нашло примену у медицини (Zha и сар., 2004) као комерцијално доступни лекови. Други деривати хидантоина се примењују као синтетички и аналитички реагенси, у пољопривреди, индустрији и козметици. Деривати хидантоина се највише користе у медицини као антиконвулзиви у лечењу епилепсије (Scholl и сар., 1999) и срчане аритмије (Anger и сар., 2001), а у скорије време и тумора. Нирванол, 5-етил-5-фенилхидантоин, се први примењивао у медицини док није установљено његово токсично дејство при редовној употреби. Нирванол је заменио фенитоин, 5,5-дифенилхидантоин, који је најефикаснији антиконвулзант са најмањим хипотоничним ефектом.

### 1.9.1. Физичке особине хидантоина

Хидантоини су чврсте, кристалне супстанце које се топе на високим температурама. Хидантоини са супституентима на атомима азота се топе на нижим температурама од несупституисаних. То се објашњава смањеном поларношћу молекула и одсуством водоничних веза. Хидантоини су слабе киселине. Киселост је последица постојања N-H везе у положају 1 и 3 која се налази између две електрон-акцепторске карбонилне групе. Код N-1 супституисаних хидантоина, алкил групе у положајима N-1 и C-5 не утичу на јонизацију, међутим, арил и други електрон-привлачећи супституентни повећавају киселост хидантоина, као код 5,5-дифенил-хидантоина. Увођење арилметиленског ланца у положај C-5 повећава

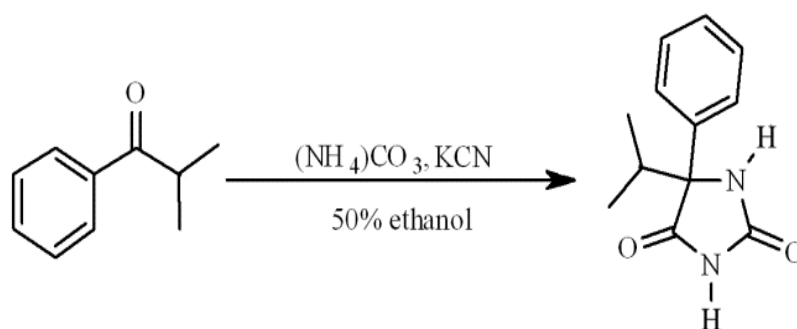
киселост водониковог атома у положају N-1, што је последица делокализације негативног наелектрисања на N-1.

### **1.9.2. Физиолошки активни деривати хидантоина и веза између њихове структуре и биолошке активности**

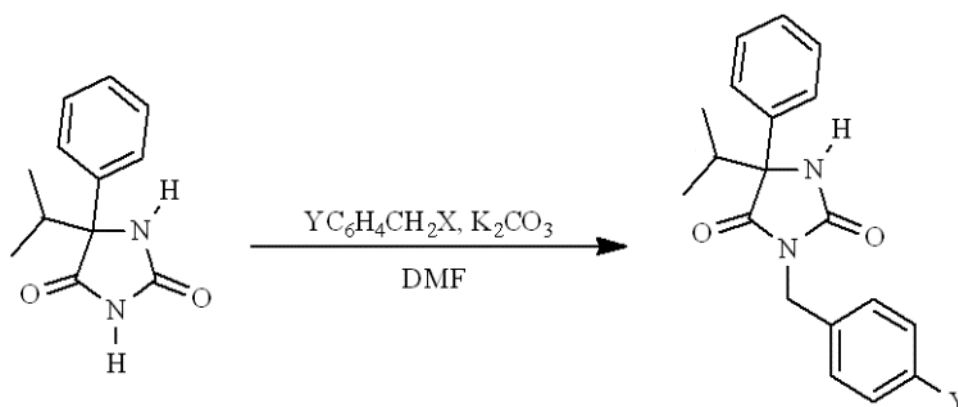
Деривати хидантоина имају широку примену - као антиконвулзанти, антиаритмици, бактерициди, фунгициди и лекови у терапији против тумора и инфекције вирусом хумане имунодефицијенције (Орајић и сар., 2005; Рајић и сар., 2006). Фенитоин, 5,5-дифенилхидантоин, је незаменљив у лечењу епилепсије. Први га је синтетисао Heinrich Biltz у реакцији бензила и урее. Још од четрдесетих година двадесетог века изучавана је антиконвулзивна активност хидантоина. Деловање потенцијално физиолошки активне супстанце у основи чине две ствари: транспорт лека од места примене до места деловања и интеракција молекула лека са рецептором, а обе зависе од структуре молекула. Учињено је неколико покушаја да се постави општи фармакофорни модел молекула антиконвулзанта на основу разматрања структурно различитих једињења сличне антиконвулзивне активности. Проучавајући карактеристике тродимензионалне молекулске структуре неколико антиконвулзивних лекова, посебно фенитоина и диазепама, Camerman A. (1970.) и Camerman N. (1972.) су дошли до закључака да оба молекула имају гломазне хидрофобне групе (два фенил језгра код фенитоина и фенил и хлорфенил група код диазепама) са сличном узајамном оријентацијом у простору. Такође, када су два једињења на малом растојању тако да се хидрофобне групе преклапају, две електрон-донорске групе (два атома кисеоника карбонилне групе код фенитоина и карбонилног кисеоника и тригоналног атома азота код диазепама) заузимају сличне положаје и оријентације у простору.

Scholl и сарадници (1999.) су покушали да сагледају повезаност структуре деривата хидантоина и њихове физиолошке активности применом различитих физичко-хемијских метода. Тако су за репрезентативан број деривата хидантоина одредили утицај водоничне везе на корелацији структуре и активности деривата хидантоина, хидрофилне и липофилне делове површине структуре молекула како би проценили њихове релевантне способности преношења и могућности интеракције са рецепторима у одговарајућим положајима. Интеракција молекула лека и рецептора је електростатичке природе и зависна је од интеракција са рецептором.

Прикупљање детаљних структурних и фармаколошких података олакшава разумевање утицаја структуре на биолошку активност и омогућава моделовање нових деривата са унапређеном антипролиферативном активношћу и смањеним бројем споредних ефеката. У циљу унапређивања и разумевања механизма деловања нових дериват хидантоина, у овој дисертацији коришћени су деривати хидантоина за које важи следеће: прво је одрађена синтеза 5-изопропил-5-фенилхидантоина (Слика 15), након тога је извршена синтеза нове серије деривата хидантоина **3-(4-супституисани бензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоин** чији је поступак синтезе и детаљна карактеризација у потпуности описана у докторској дисертацији Nmuda S. која је одбрађена на Универзитету у Београду на Технолошко-металуршком факултету 2014. године (Слика 16).



Слика 15. Синтеза 5-изопропил-5-фенилхидантоина



Слика 16. Синтеза 3-(4-супституисани бензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоина  
(Y: CH<sub>3</sub>O (1), CH<sub>3</sub> (2), H (3), Cl (4), Br (5), CN (6), NO<sub>2</sub> (7))

У овој докторској дисертацији експериментално је испитана биолошка активност серије од седам деривата хидантоина који поседују донорске и акцепторске групе у положају N-3 (Слика 16). Одређена је њихова антипролиферативна и антимиграторна активност према ћелијској линији хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116 и тумора дојке MDA-MB-231.

## **2. Циљеви истраживања**

На основу података из литературе о различитим биолошким ефектима деривата хидантоина као и резултата Тришовића и сарадника (Trišović и сар., 2011) који су показали да активност 3-бензил деривата дифенилхидантоина није одређена само физичко-хемијским својствима супституената на N-3 позицији, а што указује на могућност да једињења која носе бензил јединицу боље интерагују са молекуларним циљем деловања, колега Nmuda S. са Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду је синтетисао нове **3-супституисане-5-изопропил-5-фенилхидантоине** које је детаљно хемијски окарактерисао и описао их у својој докторској дисертацији (Nmuda S., 2014).

На основу свега познатог одлучено је да се за испитивање антитуморских механизма у овој докторској дисертацији користе следећи деривати хидантоина:

- (1) 3-бензил-5-изопропил-5-фенилхидантоин  $C_{19}H_{20}N_2O_2$ ,
- (2) 3-(4-метилбензил)-5-изопропил -5-фенилхидантоин  $C_{20}H_{22}N_2O_2$ ,
- (3) 3-(4-метоксибензил)-5-изопропил -5-фенилхидантоин  $C_{20}H_{22}N_2O_3$ ,
- (4) 3-(4-хлоробензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоин  $C_{19}H_{19}N_2O_2Cl$ ,
- (5) 3-(4-бромбензил)-5-изопропил -5-фенилхидантоин  $C_{19}H_{19}N_2O_2Br$ ,
- (6) 3-(4-нитробензил)-5-изопропил -5-фенилхидантоин  $C_{19}H_{19}N_3O_4$ ,
- (7) 3-(4-цијанбензил)-5-изопропил -5-фенилхидантоин  $C_{20}H_{19}N_3O_2$

Циљ овог истраживања је да се утврде механизми антитуморског дејства наведених деривата. На овај начин је добијен увид у њихова основна антитуморска својства и утврђен је њихов антипролиферативни потенцијал. Након почетног прегледа свих седам деривата, одабрани су деривати са којима су се наставила даља испитивања, а све у циљу издвајања деривата (пролека) који би ушао у даља *in vivo* испитивања на анималним моделима одговарајућих тумора, као и евентуалног развоја терапеутика базираних на дериватима хидантоина за лечење тумора.

У свим експериментима коришћене су ћелије хуманог тумора дебелог црева, HCT-116 ћелијска линија, и хуманог тумора дојке, MDA-MB-231 ћелијска линија, које су се показале као погодан модел систем за проучавање ова два типа тумора, као и ћелијска линија нормалних хуманих фибробласта MRC-5 (за испитивање биокомпатибилности).

Да би се постигао наведени циљ експериментални рад је реализован у више фаза чији су појединачни истраживачки циљеви били:

1. Испитати антипролиферативна дејства наведених деривата хидантоина
2. Испитати способност наведених деривата хидантоина да индукују апоптозу туморских ћелија, као и да доведу до промена у ћелијском циклусу туморских ћелија
3. Испитати ефекат наведених деривата хидантоина на продукцију реактивних врста кисеоника и азота
4. Испитати ефекат наведених деривата хидантоина на миграторни потенцијал туморских ћелија

5. Испитати ефекат наведених деривата хидантоина на експресију гена за индуцибилну синтазу азот оксида (iNOS), као и на активност ензима iNOS
6. Испитати ефекат наведених деривата хидантоина на експресију гена за циклооксигеназу-2 (COX-2), као потенцијалног регулатора ћелијске миграције и пролиферације
7. Испитати ефекат наведених деривата хидантоина на експресију гена за матриксну металопроотеиназу-9 (MMP-9) која промовише инвазију миграторних ћелија и тиме доприноси метастатском потенцијалу тумора



### **3. Материјал и методе**

### 3.1. Хемикалије и реагенси

За израду експерименталних процедура описаних у овој тези, коришћене су следеће хемикалије и реагенси:

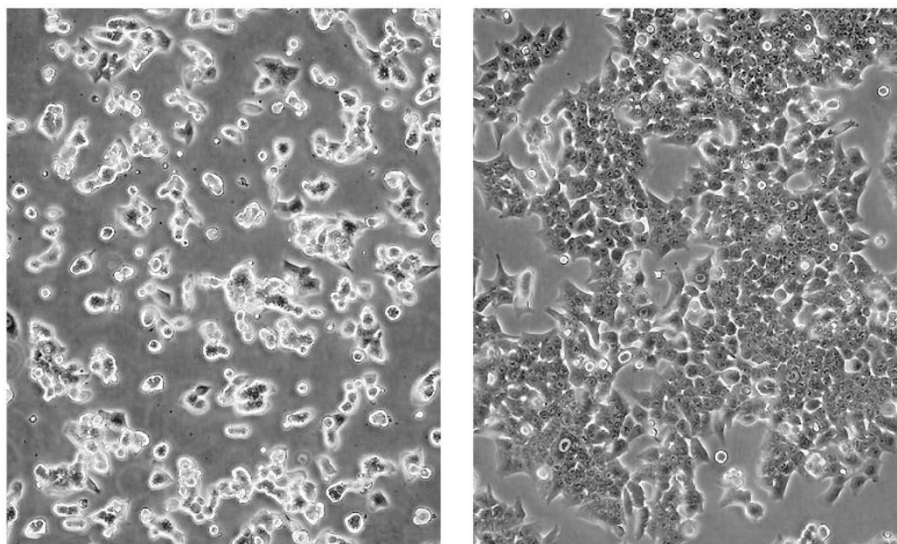
3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ) (Serva, Немачка), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензоева киселина) (DTNB) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), BSA (енгл. *Bovine Serum Albumine*) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), INT-a (енгл. *2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride*) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), Multiplex PCR кит (Qiagen, Немачка), N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид (Serva, Немачка), NBT (енгл. *Nitroblue Tetrazolium*) (Serva, Немачка), Tris база (Serva, Немачка), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), TRIzol (Ambion, САД), вода PCR чистоће (Ambion, САД), диметил-сулфоксид (енгл. *Dimethyl Sulfoxide*, DMSO) (Serva, Немачка), етанол PCR чистоће (Serva, Немачка), етидијум бромид (Serva, Немачка), етилендиамин тетрасирћетна киселина (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), изопропанол PCR чистоће (Serva, Немачка), кит за детекцију апоптозе AnnexinV-FITC/7AAD (Beckman Coulter, САД), кит за превођење РНК у комплементарну ДНК (Invitrogen, САД), медијум за гајење ћелија (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) (Invitrogen, САД), натријум додецил сулфат (енгл. *Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS), натријум нитрит (NaNO<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), пеницилин (Invitrogen, САД), пропиридијум јодид (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), стрептомицин (Invitrogen, САД), сулфаниламид (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), сулфосалицилна киселина (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), трипан плаво (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), трипсин-EDTA (Gibco, САД), фетални говеђи серум (енгл. *Fetal Bovine Serum*, FBS) (Invitrogen, САД), физиолошки раствор са фосфатним пуфером (енгл. *Phosphate Buffer Saline*, PBS) (Invitrogen, САД), хлороводонична киселина (HCl) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, САД), хлороформ PCR чистоће (Serva, Немачка).

### 3.2. Ћелијско-молекуларне анализе

#### 3.2.1. Ћелијске линије

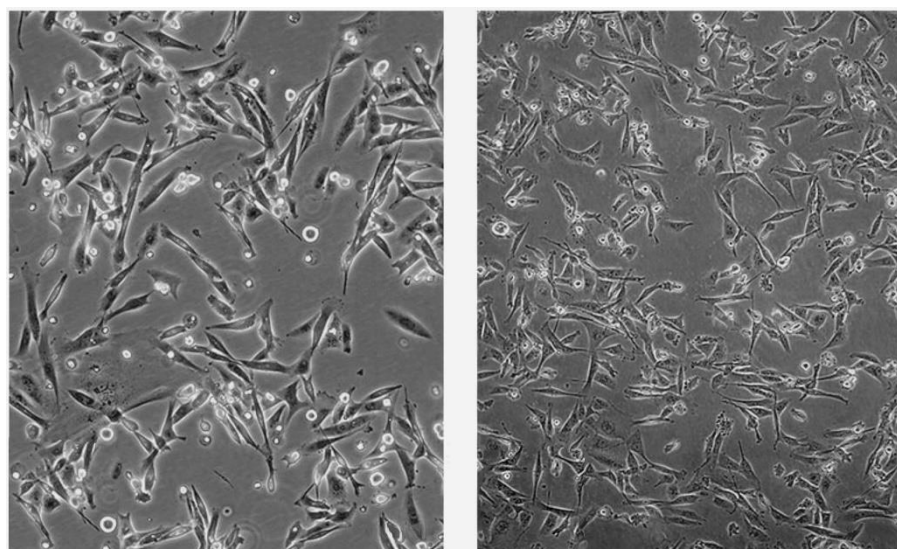
У експериментима су коришћене две туморске ћелијске линије: ћелијска линија хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116 и ћелијска линија хуманог тумора дојке, МДА-МВ-231. Такође, коришћена је и МРС-5 ћелијска линија нормалних хуманих фибробласта плућа. Ћелије су узгајане у стерилним фласковима, површине 25 cm<sup>2</sup> или 75 cm<sup>2</sup> у комплетном DMEM медијуму са високим садржајем глукозе (4,5 g/l) и додатком 10% феталног говеђег серума, 100 IU/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина. Спољашњи услови у којима су узгајане ове ћелијске културе подразумевају температуру од 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности ваздуха.

Главне карактеристике ћелијске линије хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116 су адхерентност, епителна морфологија (Слика 17), експресија гена за кератин, имунопероксидазу, TGF-β1 и TGF-β2, као и мутација у кодону 13 гена за K-Ras протоонкоген.



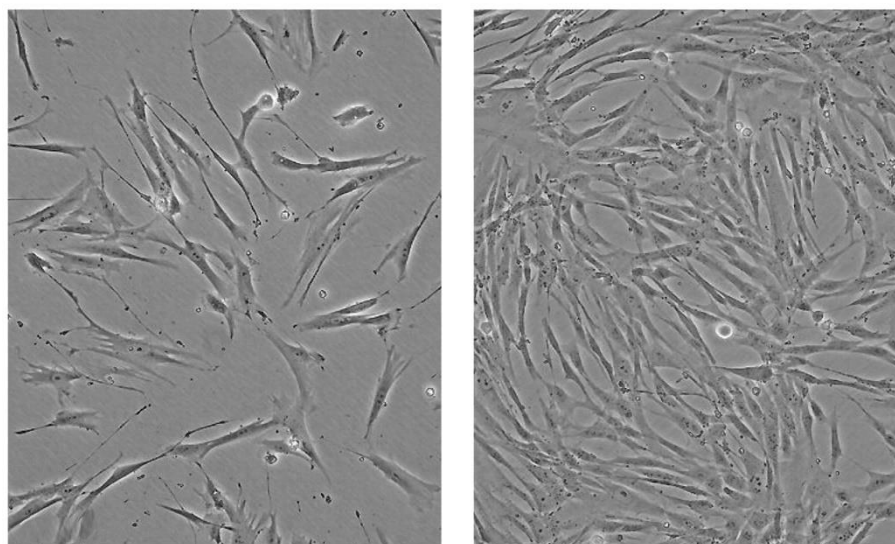
**Слика 17.** Морфолошки изглед HCT-116 ћелија под фазно-контрастним микроскопом  
(Слика преузета са сајта: <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

Ћелијска линија хуманог карцинома дојке, MDA-MB-231, по морфолошким карактеристикама припада епителним ћелијама (**Слика 18**), вретенастог је облика и такође има способност адхезије за пластичну површину. Карактеристика ових ћелија је да не експримирају рецепторе за естроген и прогестерон и да немају повећану експресију Her2 гена.



**Слика 18.** Морфолошки изглед MDA-MB-231 ћелија под фазно-контрастним микроскопом  
(Слика преузета са сајта: <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

Трећа ћелијска линија коришћена у овој тези је имортализована ћелијска линија нормалних хуманих фибробласта плућа, MRC-5 (**Слика 19**). Ове ћелије су пореклом од феталног ткива плућа. MRC-5 ћелије су издуженог, неправилног облика, а карактерише их диплоидни кариотип и способност адхезије за пластичну површину.



**Слика 19.** Морфолошки изглед MRC-5 ћелија под фазно-контрастним микроскопом  
(Слика преузета са сајта: <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

Све три ћелјске линије набављене су из репозиторијума ћелијских култура компаније АТСС (енгл. *American Type Culture Collection*).

### 3.2.2. Експериментални дизајн

У експериментима је коришћена серија деривата хидантоина коју је синтетисао Нмуда S. на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду и детаљно је хемијски окарактерисао, и испитиван је утицај деривата на туморске ћелије. За иницијално испитивање антипролиферативног ефекта коришћене су следеће концентрације деривата хидантоина 0,01; 0,1; 1; 10; 50 и 100  $\mu\text{M}$ , а након тога одабране су две концентрације (1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ ) за сва даља тестирања. Сви деривати су првобитно растворени у DMSO-у у концентрацији од 1 M, а од овог штока направљени су радни раствори наведених концентрација у комплетном DMEM-у.

За одређивање вијабилности МТТ тестом, НСТ-116, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелије су засејане у микротитарске плоче са 96 бунарића (1 $\times$ 10<sup>4</sup> ћелија по бунарићу) и остављене 24 сата у инкубатору (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% влажности). Затим, ћелије су третиране растворима серије деривата хидантоина (0,01; 0,1; 1; 10; 50 и 100  $\mu\text{M}$ ) у запремини од 100  $\mu\text{l}$  комплетног DMEM-а. Контролним, нетретираним ћелијама је додато 100  $\mu\text{l}$  комплетног DMEM-а.

За праћење цитотоксичности LDH тестом, НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије су засејане у микротитарске плоче са 96 бунарића (1 $\times$ 10<sup>4</sup> ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације, ћелије су третиране растворима деривата хидантоина који су показали најбољу активност (деривати **0**, **3** и **4**), у запремини од 100  $\mu\text{l}$  у концентрацијама од 0,01; 0,1; 1; 10; 50 и 100  $\mu\text{M}$ . Контролним, нетретираним ћелијама је додато 100  $\mu\text{l}$  комплетног DMEM-а. У циљу одређивања типа ћелијске смрти проточном цитометријом, Annexin V/7-AAD бојењем, активности каспаза и промена у ћелијском циклусу, НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије су засејане у микротитарске плоче са шест бунарића (1 $\times$ 10<sup>6</sup> ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације, ћелије су третиране растворима деривата хидантоина који су показали најбољу активност (деривати **0**, **3** и **4**) у концентрацијама од 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у запремини од 2 ml

комплетног DMEM-а. Контролним, нетретираним ћелијама је додато 2 ml комплетног DMEM-а.

Редокс статус HCT-116 и MDA-MB-231 процењен је на основу два теста: NBT тест у коме се мери концентрација супероксид анјон радикала, и Griess-ов тест који служи за детекцију концентрације нитрита у ћелијама. За сваки појединачни тест, ћелије су засејане у микротитарске плоче са 96 бунарића ( $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу). Исти број ћелија је коришћен и у тесту за одређивање тоталног и редукованог глутатиона. За третман хидантоинима коришћене су исте концентрације као и у случају MTT и LDH теста: 0,01; 0,1; 1; 10; 50 и 100  $\mu\text{M}$  припремљених у 100  $\mu\text{l}$  комплетног DMEM-а. Контролним, нетретираним ћелијама је додато 100  $\mu\text{l}$  комплетног DMEM-а.

За испитивање миграторног потенцијала, HCT-116 и MDA-MB-231 ћелије су засејане у микротитарске плоче са шест бунарића ( $1 \times 10^6$  ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације, ћелије су третиране растворима деривата који су показали најбољу активност (деривати **0**, **3** и **4**) у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у запремини од 2 ml комплетног DMEM-а. Контролним, нетретираним ћелијама је додато 2 ml комплетног DMEM-а.

Приликом испитивања генске експресије PCR методом, HCT-116 и MDA-MB-231 ћелије су засејаване у флашкове површине 25  $\text{cm}^2$  ( $1 \times 10^6$  ћелија по фласку) и инкубиране су док нису достигле конфлуентност од око 90%. Након тога, ћелије су третиране растворима одабраних деривата хидантоина (**0**, **3** и **4**) у запремини од 5 ml, у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ . Контролним, нетретираним ћелијама је додато 5 ml комплетног DMEM-а.

Приликом испитивања улоге и активности сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање ћелија применом имуноблота, HCT-116 и MDA-MB-231 ћелије су засејаване у микротитарске плоче са шест бунарића ( $1 \times 10^6$  ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације, ћелије су третиране растворима деривата који су показали најбољу активност (деривати **0**, **3** и **4**) у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у запремини од 2 ml комплетног DMEM-а. Контролним, нетретираним ћелијама је додато 2 ml комплетног DMEM-а.

### 3.3. Поступак пасажирања ћелија

Ћелије растворене у 1 ml комплетног DMEM медијума који садржи 10% DMSO чувају се у криотубама у течном азоту на  $-196\text{ }^\circ\text{C}$ . Пре сваког експеримента, ћелије се одледе и ресуспендују у 5 ml комплетног DMEM-а. Затим се суспензија ћелија центрифугира 10 минута на 1200 rpm. Супернатант се одстрани употребом вакуум пумпе, а талог у коме су ћелије ресуспендује се у 5 ml комплетног DMEM-а и пребаци се у фласк површине 25  $\text{cm}^2$ . Наредног дана замени се медијум.

Након што ћелије достигну конфлуентност од 80-90% у фласку, потребно их је пасажирати употребом трипсина и EDTA (Freshney, 1983). Укратко, поступак трипсинизације подразумева испирање ћелија са 1 ml 0,25% трипсин/EDTA, затим се додаје 1 ml за фласк површине 25  $\text{cm}^2$  или 2 ml за фласк површине 75  $\text{cm}^2$ . Након 3-5 минута, активност трипсина се неутралише додавањем 5 или 10 ml свежег DMEM-а.

### 3.4. Поступак одређивања броја вијабилних ћелија

Пре сваког експеримента број живих ћелија се одређује хемоцитометријски употребом Tripan Blue раствора.

### 3.5. Испитивање цитотоксичности и ефеката на процес апоптозе

#### 3.5.1. МТТ тест вијабилности ћелија

МТТ тест је колориметријска метода (Mosmann, 1983), којом се процењује вијабилност ћелија, а може се користити за испитивање нивоа цитотоксичности неке супстанце. Раствор МТТ је тетразолијумова со, жуте боје, која мења своју боју у љубичасто (љубичасто обојен формазан) када уђе у ћелије и изложи се деловању митохондријалне редуктазе. Интензитет боје насталог једињења пропорционалан је броју живих ћелија и одређује се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на таласној дужини од 550 nm. Тест је постављен на начин описан у одељку 3.2.3. Ћелије су инкубирани у присуству третмана хидантоинима 24, 48 и 72 сата (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% влажности ваздуха). Након сваког појединачног временског интервала, контролним ћелијама и ћелијама са третманима, додато је 20 µl по бунарићу МТТ раствора у концентрацији 5 mg/ml. Ћелије су 3 сата на 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% влажности ваздуха. По истеку периода инкубације додато је 20 µl раствора SDS-HCl (10% SDS у 0,01 M HCl) по бунарићу. Апсорбанца раствора прочитана је на ELISA читачу (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Кина) на 550 nm.

На основу добијених вредности за број вијабилних ћелија у третману, односно број мртвих ћелија (изражено у процентима) у односу на контролне, нетретирание ћелије, процењује се цитотоксичност третмана. Инхибиторне дозе које убијају половину од иницијалног укупног броја ћелија, IC<sub>50</sub> вредности (концентрација третмана која убија 50% ћелија) су прерачунате из крива дозне зависности коришћењем софтвера (CalcuSyn, BIOSOFT, Велика Британија).

#### 3.5.2. Мерење активности лактат дехидрогеназе

Лактат дехидрогеназа (енгл. *Lactate dehydrogenase*, LDH) је оксидоредуктаза, односно ензим који катализује конверзију пирувата у лактат. Пошто је LDH прилично стабилан ензим, користи се да се процени присуство оштећења и цитотоксичности. LDH тест је колориметријски тест и заснива се на две оксидо-редукционе реакције. У првој ензимској реакцији LDH редукује NAD<sup>+</sup> до NADH и H<sup>+</sup> оксидацијом лактата до пирувата; а у другој реакцији наступа реоксидација NADH + H<sup>+</sup> у NAD<sup>+</sup> при чему се тетразолијум хлорид редукује у црвено-наранцасто обојени формазан. Интензитет боје насталог једињења пропорционалан је броју ћелија у некрози којима је нарушен интегритет ћелијске мембране. Тест је постављен на начин описан у одељку 3.2.3. Затим, ћелије су лизирание додатком 200 µl по бунарићу раствора 9% Triton X-100 Након тога је микротитарска плоча центрифугирана на 1200 rpm током 15 минута на 4 °C, а 50 µl сваког ћелијског лизата пребачено је у нову микротитарску плочу. Пре самог есеја је направљена следећа реакциона смеша: 223 mg INT-а (енгл. *2-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride*), 57 mg PMS-а (енгл. *N-methylphenazonium methyl sulfate*), 575 mg NAD-а (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide*) и 3,2 g млечне киселине растворено је у 480 µl 200 mM Tris пуфера, pH 8,0. 100 µl реакционе смеше додато је у сваки лизат, и остављено је на инкубацију на собној температури 30 мин, заштићено од светлости. Апсорбанца је измерена на ELISA читачу (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Кина) на таласној дужини од 490 nm.

За LDH тест користи се формула: % мртвих ћелија = (E-C)/(T-C) × 100,

где је E апсорбанца третираних ћелија, C апсорбанца контролних ћелија и T апсорбанца ћелија третираних са Triton X-100.

### **3.5.3. Испитивање типа ћелијске смрти проточном цитометријом Annexin V/7-AAD бојењем**

Ћелије у којима је започео процес програмиране ћелијске смрти, односно апоптоза, су детектоване коришћењем Annexin-V-FITC (енгл. *Annexin-V-Fluorescein Isothiocyanate*) кита проточном цитометријом (Apoptosis Detection Kit, Beckman Coulter, САД). Annexin-V-FITC је флуоресцентна боја која се везује за фосфатидилсерине. На самом почетку процеса апоптозе, фосфатидилсерин, који се у живим ћелијама обично налази на унутрашњем делу плазма мембране, транслоцира се на спољни део мембране и постаје доступан да се веже за Annexin-V-FITC. Друга боја, 7-аминоактиномицин D (енгл. *7 Actinomycin*, 7-AAD) се везује за ћелијску ДНК у ћелијама где је ћелијска мембрана потпуно оштећена (Shounan и сар., 1998). Разликујемо четири типа ћелија:

- (а) ћелије које су Annexin-V-FITC (-) и 7-AAD (-) су вијабилне;
- (б) ћелије у раним фазама апоптозе су Annexin-V-FITC (+) и 7-AAD (-);
- (в) ћелије у касним стадијумима апоптозе су Annexin-V-FITC (+) и 7-AAD (+);
- (г) некротичне ћелије су Annexin-V-FITC (-) и 7-AAD (+).

Након 24, 48 и 72 сата од третмана, ћелије су трипсинизирани, испране PBS-ом и ресуспендоване у хладном пуферу за проточну цитометрију (1%BSA/0,01%NaN<sub>3</sub>/PBS). Annexin-V-FITC и 7-AAD су додати сваком узорку. Након 15 минута инкубације, ћелије су анализирани на проточном цитометру (FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer, Nyon, Швајцарска).

### **3.5.4. Детекција активности каспаза проточном цитофлуориметријом**

Активност каспаза, ензима укључених у апоптотску ћелијску смрт, детектована је унутарћелијским бојењем, флуоресцентно обележеним панкаспазним инхибитором који се везује за активирани каспазе (ApoStat; R&D Systems, САД). Узорци за цитофлуориметријску анализу су припремљени на следећи начин. Наиме, ћелије су након третмана хидантоинима трипсинизоване, испране у PBS-у и ресуспендоване у 500 µl пуфера за проточну цитометрију (1% BSA/0,01% NaN<sub>3</sub>/PBS). У раствор је додато 5 µl комерцијално доступног раствора панкаспазног инхибитора који је директно куплован са флуоресцентном бојом FITC. Након 30 минута инкубације у мраку, ћелије су центрифугиране (300 x g, 5 мин) и финално растворене у 200 µl 1%BSA/0,01%NaN<sub>3</sub>/PBS пре анализе. Релативно повећање флуоресценције представља меру активности каспаза. Анализа је рађена на проточном цитометру FACSCalibur flow cytometer (BDBiosciences, Немачка). Резултати представљају индекс активности каспаза у односу на контролу која је дефинисана као 1.

### **3.5.5. Анализа ћелијског циклуса проточном цитофлуориметријом**

Фрагментација ДНК, као карактеристика апоптотске ћелијске смрти, одређена је проточном цитометријском анализом ћелијског циклуса бојењем ћелија пропидијум јодидом (Калуђеровић и сар., 2005). Након инкубације ћелија новосинтетисаним дериватима хидантоина, ћелије су фиксирани у 70% етанолу на 4 °C током 30 минута. Пре саме анализе етанол је уклоњен центрифугирањем и ћелије су испране два пута PBS-ом. Након тога ћелије су ресуспендоване у PBS-у који садржи 1 mg/ml Rnase и пропидијум јодид (40 µg/ml) и инкубирани су на 37 °C у мраку 30 минута. Анализа је урађена помоћу (FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer, Nyon, Швајцарска), а сама обрада података применом програма FlowingSoftware (<http://www.flowingsoftware.com/>).

### 3.6. Испитивање параметара редокс статуса

#### 3.6.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала

Унутарћелијска детекција супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у узорку је одређена колориметријском анализом и заснива се на редукцији NBT до формазана у присуству  $O_2^{\cdot-}$  (Auclair и Voisin, 1985). Током реакције, боја NBT-а се мења из жуте у сиво-црну. Количина редукованог NBT-а директно је пропорционална концентрацији продукованог супероксид анјона у ћелијама. Тест се изводи додавањем 10  $\mu$ l раствора NBT-а у концентрацији 5 mg/ml у сваки бунарић микротитарске плоче са претходно засејаним ћелијама. Након инкубације од 45 минута (37°C, 5%  $CO_2$ ) настало формазанско једињење је растворено у 10  $\mu$ l DMSO-а. Апсорбанца раствора очитана је на таласној дужини од 570 nm (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Кина). Количина редукованог NBT-а је одређена променом апсорпције раствора на 570 nm, на основу молског коефицијента екстинкције за моноформазан који износи 15 000  $M^{-1}cm^{-1}$ . Коришћена је следећа формула за прерачун концентрације редукованог NBT-а:

$$nmol\ NBT/ml = A/0,015 \times V_{tot}/V_{ex},$$

где је А апсорбанца;  $V_{tot}$  укупна запремина раствора у бунарићу (120  $\mu$ l) и  $V_{ex}$  запремина ћелија са третманом (100  $\mu$ l).

#### 3.6.2. Одређивање концентрације нитрита

Колориметријска анализа продукције нитрита ( $NO_2^-$ ) у ћелијском медијуму као индиректни показатељ продукције реактивних азотних врста изводи се методом коју је првобитно установио Griess (1879). Принцип методе се базира на реакцији сулфаниламидне киселине и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорида са нитритима ( $NO_2^-$ ), дајући стабилно пурпурно обојено азотно једињење. Концентрација нитрита је директно пропорционална интензитету пурпурне боје. Тест је постављен на начин описан у одељку 3.2.3. 50  $\mu$ l супернатанта сваког узорка пребачено је у нове микротитарске плоче. Затим је додато по 50  $\mu$ l сулфаниламидне киселине у све бунариће. Плоча је инкубирана 10 минута на собној температури, заштићена од светла. У следећем кораку, додато је по 50  $\mu$ l N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид. Апсорбанца је измерена на таласној дужини од 550 nm (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Кина). Концентрација нитрита је прерачуната преко једначине стандардне криве конструисане помоћу добијених апсорбанци раствора  $NaNO_2$  познатих концентрација.

#### 3.6.3. Одређивање концентрације тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона

Колориметријско одређивање унутарћелијског редукованог глутатиона (GSH) се заснива на оксидацији GSH користећи 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB) при чему се формира жути продукт, 5'-тио-2-нитробензоева киселина (TNB) (Baker и сар., 1990). Ћелије су након инкубације са третманима, центрифугиране 10 минута на 1000  $\times$  g на 4 °C, а супернатант је одстрањен. Талог у коме су ћелије је ресуспендован у 2,25% сулфосалицилне киселине и ћелије су лизирани наизменичним циклусима замрзавања на -80 °C и загревања на 37 °C (3 циклуса/15 мин) након чега су центрифугиране 30 мин/1000  $\times$  g. Супернатант (50  $\mu$ l) је пребачен у нову плочу и додато је 100  $\mu$ l реакционе смеше која је припремљена непосредно пре почетка рада и садржи (фосфатни EDTA пуфер (pH 7,4; 150  $\mu$ l), 0,7 U глутатион редуктазе, 1 mM NADPH и 1 mM DTNB у DMSO (1%)). Ова смеша се



користила за детекцију тоталног глутатиона, док се за редуковани користила смеша без глутатион редуктазе. Микротитарске плоче су инкубирани 5 минута на собној температури и након тога је измерена апсорбанца на 405 nm на ELISA читачу за микротитарске плоче (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Кина). Концентрација тоталног и редукованог глутатиона је прерачуната преко једначине стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација GSH.

Концентрација оксидованог глутатиона (GSSG) представља разлику тоталног и редукованог глутатиона. Концентрације тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона су изражене у pmol/ml.

### 3.7. Миграциони ћелијски есеј 2D (Boyden chamber)

Миграциони капацитет ћелија је одређиван њиховом способношћу да пролазе кроз поре поликарбонатне мембране (8  $\mu\text{m}$  пречник поре; Greinerbio-one, Швајцарска) смештених на дну миграционих коморица. Тестирање покретљивости (миграције) ћелија је базирано на поступку који је описао Chen (2005). Овај есеј је изведен 24, 48 и 72 сата након третмана ћелија одабраним дериватима хидантоина. Наиме, ћелије су трипсинизирани и пребачени на мембрану,  $1 \times 10^5$  ћелија по бунарићу у 500  $\mu\text{l}$  комплетног DMEM-а. Доњи бунарићи у контроли су садржали 750  $\mu\text{l}$  DMEM-а са 10% FBS-а, док су бунарићи са третманима садржали деривате хидантоина у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  растворени у 750  $\mu\text{l}$  DMEM-а са 10% FBS-ом. Након 6 сати инкубације на 37 °C, заостале ћелије са горње стране мембране су скидане памучним штапићима. Преостале ћелије које су мигрирале на доњу страну мембране, се фиксирају 4% параформалдехидом у трајању од 20 мин на собној температури, а потом се обоје 0,1% бојом кристал виолет (енгл. *Crystal violet*) раствореном у 200 mM 2-(N-morpholino) етан сулфонској киселини (MES пуфер, pH = 6,0) у трајању од 10 минута. Након додавања 10% сирћетне киселине која раствара боју, очитана је апсорбанца на ELISA читачу за микротитарске плоче (ELISA reader Optic System RT2100-C, Rayto, Кина). Индекс миграције је израчунат као однос апсорбанце третираних ћелија и апсорбанце контроле помножен са 100, како би се добила процентуална вредност.

### 3.8. Испитивање генске еспресије гена за *iNOS*, *COX-2* и *MMP-9*

#### 3.8.1. Изоловање РНК из ћелија

Изоловање РНК из ћелијског лизата засновано је на екстракцији ове нуклеинске киселине употребом фенола и хлороформа који су први описали Chomczynski и Sacchi (1987). Наиме, ћелије су трипсинизирани, центрифугирани (300  $\times$  g, 10 минута) и ресуспендовани у TRIzol реагенсу ( $1 \times 10^6$  ћелија у 1 ml TRIzol-a). Након тога додато је 200  $\mu\text{l}$  хлороформа. Узорци су затим центрифугирани на 12 000  $\times$  g, 15 минута, 4 °C. Након центрифугирања, водена фаза (која се издвојила на врху) је пребачена у нову микротубу. Додато је 500  $\mu\text{l}$  изопропанола на 1 ml TRIzol-a и смеша је инкубирана 10 минута на собној температури. Узорци су центрифугирани на 12 000  $\times$  g, 15 минута, 4°C. Супернатант је уклоњен, а РНК која се налази у талогу испрана је раствором 80% етанола. Узорци су центрифугирани на 7500  $\times$  g, 5 минута, 4 °C. Преостали етанол је остављен да испари на ваздуху 2-3 минута, а затим је талог, односно изолована РНК растворена у 20  $\mu\text{l}$  воде PCR чистоће и инкубирана на 55 °C на термоблоку 2-3 минута. У сваком узорку одређена је концентрација изоловане РНК на биофотометру (Eppendorf BioPhotometer plus, Немачка). За процену чистоће изоловане РНК коришћен је параметар који је представљен односом апсорбанци на 280 nm и 260 nm ( $A_{280/260}$ ) и који треба да буде око 2 да би се изолована иРНК

сматрала довољно чистом за даљу употребу у квантификацији генске експресије. Водени раствор изоловане иРНК чува се на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.2. Реверзна транскрипција информационе РНК (RT PCR)

Након изолације, иРНК је преведена у комплементарну ДНК (енгл. *Complementary DNA*, cDNA) у реакцији реверзне транскрипције која је изведена према спецификацији произвођача (Super Script First Strand Synthesis Kit, Invitrogen, САД). Претходно припремљен раствор који садржи  $5\text{ }\mu\text{M}$  прајмера,  $1\text{ x}$  реакциони пуфер,  $1\text{ mM}$  деоксирибонуклеотид трифосфата,  $20\text{ U}$  инхибитора РНК-за и  $200\text{ U}$  реверзне транскриптазе помешан је са  $500\text{ ng/ml}$  РНК. Реакција реверзне транскрипције изведена је у апарату за PCR (Eppendorf Mastercycler, Немачка), коришћењем следећег програма са наведеним циклусима:  $5\text{ минута}$  на  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $2\text{ сата}$  на  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; и  $5\text{ мин}$  на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Узорци комплементарне ДНК се чувају на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.3. Квантитативни PCR (qPCR)

Синтетисана cDNA умножена је применом qPCR- (Quantitative PCR, квантитативни PCR) реакције у регионима где се налазе гени од интереса: ген за индуцибилну азот оксид синтазу (енгл. *Inducible Nitrogenoxid synthase*, iNOS), матрикс металопроотеиназе 9 (енгл. *Matrix Methalloproteinase 9*, MMP-9), циклооксигеназу 2 (енгл. *Cyclooxygenase 2*, COX-2) и  $\beta$ -актин. За ове гене коришћен је сет прајмера који је приказан у Табели 1.

Табела 1. Секвенце парова прајмера коришћене у експресији гена

Циљни ген	Секвенце прајмера
$\beta$ -актин	Fw: 5'-GTTCTCAAGGCACAGGTCTC-3'
	Rev: 5'-GGGAGACCAAAGCCTTCAT-3'
iNOS	Fw: 5'-GTTCTCAAGGCACAGGTCTC-3'
	Rev: 5'-GCAGGTCACTTATGTCACTTATC-3'
COX-2	Fw: 5'-CCCTTGGGTGTCAAAGGTA-3'
	Rev: 5'-GCCCTCGCTTATGATCTGTC-3'
MMP-9	Fw: 5'-ACCTCGAACTTTGACAGCGACA-3'
	Rev: 5'-GATGCCATTCACGTCGTCCTTA-3'

Припремљена смеша која садржи  $5\text{ pmol}$  одговарајућих прајмера,  $1\text{ x}$  SYBR FAST Universal Master Mix који садржи ROX референту боју (Applied Biosystems), TaqMan полимеразу и  $2\text{ }\mu\text{l}$  cDNA, пребачена је у апарат за qPCR 7500 RealTimeSystem (Applied Biosystems). За ову PCR реакцију коришћен је следећи програм са наведеним циклусима:  $3\text{ мин}$  на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $40\text{ циклуса}$  од по  $15\text{ секунди}$  на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  и од по  $60\text{ секунди}$  на  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.9. Испитивање улоге и активности сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање ћелија применом имуноблота

Ћелије су лизирани у пуферу ( $30\text{ mM}$  Tris-HCl pH 8,0,  $150\text{ mM}$  NaCl,  $1\%$  NP-40, раствор коктела протеазних инхибитора) на леду, центрифугиране на  $14000 \times g$  током  $15\text{ мин}$  на  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а у сакупљеним супернатантима је одређена концентрација протеина. Концентрације протеина у узорцима смо подесили на исту концентрацију ( $1\text{ mg/ml}$ ). Сваки узорак смо наносили у запремини од  $20\text{ }\mu\text{l}$  по бунару. Једнаке количине протеина из сваког узорка су одвојене помоћу SDS-PAGE електрофорезе и пребачене на нитроцелулозне мембране (Bio-

Rad, Немачка). Узорци су припремљени у пуферу за узорке (80  $\mu$ l узорка и 20  $\mu$ l 5 х конц. пуфера за узорке). Узорци су затим нанети на гел и најпре су концентровани током проласка кроз 5% полиакрирамидни гел (гел за концентровање), а затим су протеини из лизата раздвојени на основу молекулске масе проласком кроз 10 % полиакрирамидни гел (гел за раздвајање). Напон при проласку узорка кроз гел је био 80 V, а кроз гел за раздвајање 120 V. По завршетку SDS-PAGE електрофорезе протеини су трансферовани на нитроцелулозне мембране (Bio-Rad, Немачка). Мембрана је након трансфера остављена преко ноћи на сатурацију у раствору 5% BSA/PBS-у. Сутрадан, мембрана је инкубирана у присуству антитела специфичних за phospho-JNK, JNK, phospho-ERK1/ERK2, ERK1/ERK2 (RND systems) и  $\beta$ -актин (RND systems) 60 минута на собној температури. Након корака испирања мембране раствором 0,05% Tween 20/PBS, додато је секундарно антитело, анти-IgG антитело коњуговано пероксидазом, специфичне протеинске траке су визуализоване коришћењем побољшаних хемилуминесцентних реагенса користећи Chemi Doc MP Imaging System (BioRad, Немачка).

### 3.10. Анализа и статистичка обрада резултата

Сви резултати су приказани табеларно или графички. Сви појединачни експерименти рађени су у трипликату, а добијени резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка, коришћењем SPSS софтверског пакета за статистичку обраду податка (SPSS for Windows, version 17, 2008, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). За утврђивање постојања разлике између средњих вредности коришћени су Student's T test и Independent test. Разлике  $p < 0,05$  су сматране значајним. IC<sub>50</sub> вредности су прерачунате из крива дозне зависности коришћењем софтвера (CalcuSyn, BIOSOFT, Велика Британија). Процент вијабилних, рано и касно апоптотских, као и некротских ћелија је проточном цитометријом утврђен помоћу Flowing софтвера. За анализу ћелијског циклуса и каспазне активности, подаци су обрађени у FlowJo програму. Нивои генске експресије су одређивани коришћењем софтвера Fast Real-Time PCR Instrument.

## **4. Резултати**

Током ове студије анализирани су ефекти серије седам деривата **3-супституисаних-5-изопропил-5-фенилхидантоина** на хуманој ћелијској линији тумора дебелог црева, НСТ-116 и ћелијској линији тумора дојке, MDA-MB-231. Добијени резултати пружају разумевање утицаја који ова серија деривата хидантоина има у регулацији различитих ћелијских механизма тумора дебелог црева и тумора дојке у *in vitro* условима.

У оквиру овог експерименталног рада испитивани су различити биолошки ефекти које остварују деривати хидантоина у концентрацијама од 0,01  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  према ћелијској линији хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116, и ћелијској линији тумора дојке, MDA-MB-231, у култури *in vitro*.

#### 4.1. Биокомпатибилност

Утицај испитиваних деривата хидантоина на потенцијал пролиферације ћелијске линије нормалних хуманих фибробласта плућа, MRC-5, током 24 сата мерен је МТТ тестом, у циљу процене биокомпатибилности испитиваних деривата хидантоина. Резултати приказани у **Табели 2** показују задовољавајућу биокомпатибилност тестирних деривата хидантоина. Ниво пролиферације култивисаних MRC-5 ћелија у присуству испитиваних деривата хидантоина био је већи од 85% у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама чији је ниво пролиферације дефинисан као 100%. У складу са тим, анализа биокомпатибилности јасно је показала да тестирани деривати хидантоина не испољавају неспецифично токсично дејство према нормалним ћелијама хуманих фибробласта плућа, квалификујући их као погодне деривате за даља биолошка истраживања ради њихове потенцијалне примене као антипролиферативних/антитуморских агенаса (потенцијалних пролекова).

**Табела 2.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на вијабилност MRC-5 ћелија

Бр./Конц.	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>0</b>	98 $\pm$ 1,6 *	93 $\pm$ 2,1 *	90 $\pm$ 1,7 *	85 $\pm$ 1,3 *	89 $\pm$ 1,8 *	90 $\pm$ 2,3 *
<b>1</b>	92 $\pm$ 0,8 *	90 $\pm$ 2,5 *	89 $\pm$ 2,4 *	88 $\pm$ 2,9 *	89 $\pm$ 3,2 *	89 $\pm$ 1,7 *
<b>2</b>	94 $\pm$ 1,7 *	90 $\pm$ 2,6 *	87 $\pm$ 2,5 *	91 $\pm$ 1,6 *	90 $\pm$ 2,1 *	92 $\pm$ 0,4 *
<b>3</b>	96 $\pm$ 1,1 *	93 $\pm$ 0,7 *	90 $\pm$ 1,9 *	89 $\pm$ 1,4 *	93 $\pm$ 0,6 *	94 $\pm$ 0,2 *
<b>4</b>	93 $\pm$ 0,1 *	94 $\pm$ 0,8 *	90 $\pm$ 1,1 *	91 $\pm$ 1,3 *	88 $\pm$ 1,2 *	87 $\pm$ 1,1 *
<b>5</b>	93 $\pm$ 0,2 *	91 $\pm$ 1,6 *	90 $\pm$ 1,0 *	91 $\pm$ 1,1 *	88 $\pm$ 2,4 *	90 $\pm$ 0,5 *
<b>6</b>	93 $\pm$ 1,3 *	89 $\pm$ 2,2 *	94 $\pm$ 0,4 *	90 $\pm$ 2,6 *	92 $\pm$ 0,5 *	91 $\pm$ 1,7 *
<b>7</b>	90 $\pm$ 0,9 *	91 $\pm$ 1,9 *	91 $\pm$ 0,9 *	93 $\pm$ 0,7 *	91 $\pm$ 1,2 *	88 $\pm$ 2,1 *

Резултати су приказани као проценат пролиферације ћелија након 24 сата третмана. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (100%))

## 4.2. Молекуларни механизми антитуморске активности испитиваних деривата хидантоина

Потенцијални ефекат деривата хидантоина на вијабилност ћелија тумора дебелог црева и ћелија тумора дојке одређиван је коришћењем МТТ теста, након инкубације ћелија у присуству испитиваних деривата хидантоина у различитим концентрацијама од 0,01  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  током 24 сата (краткотрајни третман), 48 сати и 72 сата (продужени третман).

Према литературним подацима (Trišović и сар., 2011; Obradović и сар., 2013) једињење **3-безил-5,5-дифенилхидантоин**, које је у овој студији означено као полазно једињење **0**, показало је значајну антипролиферативну активност у тада испитиваној серији једињења. Сходно томе ово једињење је даље коришћено приликом поређења резултата добијених за серију деривата **изопропил-фенилхидантоина**.

Да би се испитао ефекат деривата хидантоина на различите аспекте функционисања ћелија, у првом делу ове студије испитана је серија деривата хидантоина у распону концентрације од 0,01  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$ , па су деривати са испољеним најбољим ефектом коришћени за даља испитивања директних механизма показаног антипролиферативног деловања. Испитиван је ефекат деривата хидантоина на вијабилност ћелијске линије тумора дебелог црева и ћелијске линије тумора дојке у концентрацијама од 0,01  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$ . Показана је значајна статистичка разлика у вијабилности третираних ћелија у односу на нетретиране, контролне, ћелије, како након третмана у трајању од 24 сата, тако и након третмана у трајању 48 и 72 сата и то у смеру смањења вијабилности третираних ћелија. У даљим анализама других антитуморских механизма као што су индукција апоптозе, промене у ћелијском циклусу, активација каспаза, миграциони потенцијал и инвазивна способност, одабрани деривати хидантоина су коришћени у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ .

### 4.2.1. Антипролиферативни ефекат деривата хидантоина према НСТ-116 ћелијској линији

Подаци приказани у **Табели 3** показују антипролиферативни ефекат испитиваних деривата током 24, 48 и 72 сата према НСТ-116 ћелијама. Сви испитивани деривати хидантоина током третмана су у различитим концентрацијама показали значајну антипролиферативну активност према НСТ-116 ћелијама у односу на нетретиране ћелије у сва три испитивана временска интервала. Испитивани деривати хидантоина су показали значајну дозну и временску зависност инхибиције пролиферације НСТ-116 ћелија. Антипролиферативни ефекат деривата **3** у концентрацији 100  $\mu\text{M}$  је најјачи након 24 сата третмана, док је дериват **4** остварио најјаче ефекте након 48 и 72 сата третмана.

Табела 3. Ефекат испитиваних деривата хидантоина на вијабилност НСТ-116 ћелија

Бр./Конц.	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24h</b>						
<b>0</b>	80 $\pm$ 0,9 *	71 $\pm$ 1,1 *	62 $\pm$ 1,3 *	46 $\pm$ 1,6 *	45 $\pm$ 2,1 *	49 $\pm$ 1,9 *
<b>1</b>	81 $\pm$ 2,6 *	80 $\pm$ 2,2 *	76 $\pm$ 2,1 *	58 $\pm$ 6,1 *	55 $\pm$ 2,0 *	40 $\pm$ 2,1 *
<b>2</b>	78 $\pm$ 4,1 *	74 $\pm$ 3,9 *	69 $\pm$ 4,8 *	70 $\pm$ 5,1 *	51 $\pm$ 2,1 *	47 $\pm$ 2,5 *
<b>3</b>	76 $\pm$ 2,8 *	63 $\pm$ 2,7 *	61 $\pm$ 2,6 *	59 $\pm$ 1,1 *	58 $\pm$ 1,5 *	39 $\pm$ 1,5 *
<b>4</b>	83 $\pm$ 1,8 *	75 $\pm$ 2,4 *	59 $\pm$ 4,6 *	60 $\pm$ 5,0 *	46 $\pm$ 2,3 *	41 $\pm$ 3,3 *
<b>5</b>	78 $\pm$ 2,2 *	68 $\pm$ 2,8 *	67 $\pm$ 3,3 *	57 $\pm$ 4,4 *	51 $\pm$ 2,4 *	45 $\pm$ 2,7 *
<b>6</b>	87 $\pm$ 1,5 *	77 $\pm$ 3,7 *	66 $\pm$ 2,4 *	64 $\pm$ 3,6 *	53 $\pm$ 4,8 *	44 $\pm$ 3,2 *
<b>7</b>	80 $\pm$ 2,4 *	79 $\pm$ 2,0 *	71 $\pm$ 1,3 *	70 $\pm$ 2,7 *	56 $\pm$ 3,0 *	44 $\pm$ 4,6 *
<b>48 h</b>						
<b>0</b>	66 $\pm$ 1,1 *	48 $\pm$ 1,5 *	59 $\pm$ 2,3 *	51 $\pm$ 1,4 *	42 $\pm$ 2,1 *	51 $\pm$ 1,6 *
<b>1</b>	73 $\pm$ 1,5 *	57 $\pm$ 3,4 *	56 $\pm$ 4,9 *	52 $\pm$ 2,1 *	45 $\pm$ 5,5 *	42 $\pm$ 3,1 *
<b>2</b>	71 $\pm$ 3,7 *	67 $\pm$ 3,3 *	53 $\pm$ 4,0 *	49 $\pm$ 3,7 *	46 $\pm$ 2,5 *	46 $\pm$ 2,3 *
<b>3</b>	70 $\pm$ 2,5 *	66 $\pm$ 3,6 *	56 $\pm$ 3,8 *	53 $\pm$ 3,4 *	52 $\pm$ 7,6 *	45 $\pm$ 4,8 *
<b>4</b>	81 $\pm$ 1,1 *	73 $\pm$ 1,7 *	59 $\pm$ 2,1 *	55 $\pm$ 3,3 *	40 $\pm$ 1,5 *	37 $\pm$ 1,9 *
<b>5</b>	68 $\pm$ 3,2 *	62 $\pm$ 2,7 *	46 $\pm$ 5,1 *	51 $\pm$ 3,3 *	53 $\pm$ 1,8 *	50 $\pm$ 1,1 *
<b>6</b>	82 $\pm$ 3,5 *	74 $\pm$ 1,5 *	66 $\pm$ 1,8 *	52 $\pm$ 1,2 *	40 $\pm$ 1,3 *	43 $\pm$ 3,7 *
<b>7</b>	75 $\pm$ 3,3 *	70 $\pm$ 3,1 *	68 $\pm$ 4,1 *	63 $\pm$ 4,6 *	50 $\pm$ 1,1 *	38 $\pm$ 1,6 *
<b>72 h</b>						
<b>0</b>	53 $\pm$ 1,4 *	45 $\pm$ 1,1 *	58 $\pm$ 1,5 *	59 $\pm$ 2,1 *	38 $\pm$ 1,6 *	47 $\pm$ 1,3 *
<b>1</b>	66 $\pm$ 1,1 *	47 $\pm$ 5,1 *	46 $\pm$ 3,6 *	44 $\pm$ 3,1 *	40 $\pm$ 1,3 *	35 $\pm$ 3,7 *
<b>2</b>	44 $\pm$ 3,8 *	39 $\pm$ 3,1 *	34 $\pm$ 3,3 *	27 $\pm$ 2,9 *	28 $\pm$ 1,6 *	31 $\pm$ 1,7 *
<b>3</b>	52 $\pm$ 1,4 *	45 $\pm$ 3,1 *	45 $\pm$ 4,1 *	40 $\pm$ 1,8 *	40 $\pm$ 1,3 *	39 $\pm$ 6,6 *
<b>4</b>	47 $\pm$ 2,7 *	42 $\pm$ 1,7 *	33 $\pm$ 1,3 *	31 $\pm$ 1,5 *	31 $\pm$ 2,2 *	29 $\pm$ 1,8 *
<b>5</b>	43 $\pm$ 3,0 *	42 $\pm$ 6,3 *	40 $\pm$ 1,3 *	34 $\pm$ 4,2 *	31 $\pm$ 4,1 *	30 $\pm$ 1,9 *
<b>6</b>	64 $\pm$ 1,1 *	49 $\pm$ 7,4 *	44 $\pm$ 4,1 *	42 $\pm$ 4,8 *	38 $\pm$ 1,2 *	36 $\pm$ 1,3 *
<b>7</b>	50 $\pm$ 1,2 *	40 $\pm$ 3,8 *	37 $\pm$ 3,7 *	33 $\pm$ 1,9 *	32 $\pm$ 5,6 *	31 $\pm$ 1,8 *

Резултати су приказани као проценат пролиферације ћелија након 24, 48 и 72 сата третмана. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (100%))

На основу приказаних резултата, ови деривати могу имати примену у даљим истраживањима. Резултати *in vitro* антипролиферативне активности свих испитиваних деривата према НСТ-116 ћелијама су изражени као  $IC_{50}$  вредност у Табели 4. Након 72 сата третмана НСТ-116 ћелија, сви испитивани деривати из серије **3-супституисаних-5-изопропил-5-фенилхидантоина** су показали јачи антипролиферативни ефекат у односу на ефекат након третмана у трајању 24 и 48 сата. Свих седам испитиваних **3-супституисаних-5-изопропил-5-фенилхидантоина** су показали јачи антипролиферативни ефекат у односу на полазни дериват обележен као **0**, и сви испитивани деривати хидантоина у овој докторској дисертацији су имали  $IC_{50}$  вредност мању од 0,5  $\mu\text{M}$  након третмана од 72 сата.

**Табела 4.** IC<sub>50</sub> вредности испитиваних деривата хидантоина добијене након третмана НСТ-116 ћелија у различитим временским периодима

IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	24 h	48 h	72h
<b>0</b>	19 $\pm$ 0,1	11 $\pm$ 0,1	2 $\pm$ 0,02
<b>1</b>	63 $\pm$ 0,2	8 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,01
<b>2</b>	>100	12 $\pm$ 0,1	0,0002 $\pm$ 0,07
<b>3</b>	49 $\pm$ 0,1	31 $\pm$ 0,1	0,01 $\pm$ 0,03
<b>4</b>	22 $\pm$ 0,2	10 $\pm$ 0,2	0,001 $\pm$ 0,08
<b>5</b>	50 $\pm$ 0,1	32 $\pm$ 0,1	0,0004 $\pm$ 0,06
<b>6</b>	58 $\pm$ 0,2	15 $\pm$ 0,2	0,35 $\pm$ 0,10
<b>7</b>	> 100	40 $\pm$ 0,1	0,002 $\pm$ 0,07

Ћелије су третиране различитим концентрацијама испитиваних деривата хидантоина током третмана у трајању од 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

#### 4.2.2. Антипролиферативни ефекат деривата хидантоина према MDA-MB-231 ћелијској линији

Антипролиферативни ефекат испитиваних деривата хидантоина у различитим концентрацијама према ћелијској линији хуманог тумора дојке, MDA-MB-231, након 24, 48 и 72 сата третмана приказан је у **Табели 5**. Сви деривати хидантоина су остварили значајан антипролиферативни ефекат и временску и дозну зависност према MDA-MB-231 ћелијама у поређењу са потенцијалом пролиферације нетретираних ћелија. Антипролиферативни ефекат деривата **3** је најјачи након 24 и 48 сати третмана, док је дериват **4** показао најјачи ефекат након 72 сата третмана у концентрацији 100  $\mu$ M.

Једињења која су тестирана на MDA-MB-231 ћелијама су показала значајан антипролиферативни ефекат. Резултати *in vitro* антипролиферативне активности према MDA-MB-231 ћелијама свих испитиваних деривата хидантоина су приказани као IC<sub>50</sub> вредности у **Табели 6**. Након продуженог третмана (72 сата) MDA-MB-231 ћелија, сви тестирани деривати су показали јачи антипролиферативни ефекат него након краткотрајног третмана (24 сата) и третмана од 48 сати. Сви тестирани деривати хидантоина су показали јачи антипролиферативни ефекат у односу на примарно једињење **0**, и IC<sub>50</sub> вредности након третмана 72 сата су биле мање од 10  $\mu$ M, изузев за једињење **1**.



Табела 5. Ефекат испитиваних деривата хидантоина на вијабилност MDA-MB-231 ћелија

Бр./Конц.	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24 h</b>						
<b>0</b>	85 $\pm$ 3,8 *	75 $\pm$ 3,6 *	72 $\pm$ 1,1 *	69 $\pm$ 2,9 *	53 $\pm$ 1,8 *	42 $\pm$ 2,3 *
<b>1</b>	82 $\pm$ 2,8 *	78 $\pm$ 2,0 *	75 $\pm$ 1,0 *	68 $\pm$ 2,6 *	73 $\pm$ 0,8 *	57 $\pm$ 4,3 *
<b>2</b>	84 $\pm$ 2,3 *	70 $\pm$ 5,1 *	75 $\pm$ 4,1 *	70 $\pm$ 4,2 *	57 $\pm$ 6,0 *	53 $\pm$ 6,9 *
<b>3</b>	81 $\pm$ 1,2 *	68 $\pm$ 3,2 *	67 $\pm$ 2,6 *	65 $\pm$ 4,9 *	56 $\pm$ 1,2 *	40 $\pm$ 2,1 *
<b>4</b>	83 $\pm$ 1,8 *	75 $\pm$ 2,4 *	60 $\pm$ 4,6 *	58 $\pm$ 4,8 *	46 $\pm$ 2,4 *	41 $\pm$ 3,3 *
<b>5</b>	78 $\pm$ 2,2 *	68 $\pm$ 2,8 *	70 $\pm$ 3,5 *	67 $\pm$ 3,3 *	61 $\pm$ 2,1 *	56 $\pm$ 2,4 *
<b>6</b>	87 $\pm$ 1,5 *	77 $\pm$ 3,7 *	66 $\pm$ 2,4 *	64 $\pm$ 3,6 *	53 $\pm$ 4,8 *	45 $\pm$ 3,2 *
<b>7</b>	79 $\pm$ 2,0 *	70 $\pm$ 2,7 *	76 $\pm$ 2,4 *	71 $\pm$ 1,40 *	56 $\pm$ 3,0 *	44 $\pm$ 4,6 *
<b>48 h</b>						
<b>0</b>	83 $\pm$ 2,4 *	70 $\pm$ 1,6 *	69 $\pm$ 1,5 *	65 $\pm$ 3,4 *	50 $\pm$ 2,1 *	40 $\pm$ 1,9 *
<b>1</b>	81 $\pm$ 1,8 *	72 $\pm$ 2,1 *	67 $\pm$ 3,9 *	55 $\pm$ 6,2 *	53 $\pm$ 5,9 *	58 $\pm$ 1,6 *
<b>2</b>	74 $\pm$ 3,8 *	66 $\pm$ 1,7 *	64 $\pm$ 3,0 *	61 $\pm$ 7,0 *	49 $\pm$ 2,3 *	45 $\pm$ 1,4 *
<b>3</b>	73 $\pm$ 2,0 *	68 $\pm$ 1,9 *	61 $\pm$ 2,2 *	59 $\pm$ 1,8 *	51 $\pm$ 6,1 *	35 $\pm$ 2,2 *
<b>4</b>	78 $\pm$ 1,2 *	68 $\pm$ 2,8 *	57 $\pm$ 4,3 *	52 $\pm$ 1,9 *	39 $\pm$ 3,3 *	43 $\pm$ 2,7 *
<b>5</b>	61 $\pm$ 1,4 *	57 $\pm$ 2,9 *	47 $\pm$ 1,3 *	63 $\pm$ 2,1 *	56 $\pm$ 6,7 *	38 $\pm$ 6,8 *
<b>6</b>	74 $\pm$ 2,6 *	60 $\pm$ 1,5 *	50 $\pm$ 1,7 *	67 $\pm$ 3,1 *	55 $\pm$ 2,4 *	41 $\pm$ 6,2 *
<b>7</b>	73 $\pm$ 3,0 *	67 $\pm$ 1,9 *	61 $\pm$ 3,6 *	46 $\pm$ 4,6 *	44 $\pm$ 2,0 *	42 $\pm$ 7,5 *
<b>72 h</b>						
<b>0</b>	79 $\pm$ 1,2 *	65 $\pm$ 3,3 *	58 $\pm$ 3,0 *	52 $\pm$ 1,7 *	50 $\pm$ 3,9 *	39 $\pm$ 2,8 *
<b>1</b>	71 $\pm$ 4,2 *	70 $\pm$ 3,3 *	60 $\pm$ 4,0 *	50 $\pm$ 2,7 *	49 $\pm$ 2,8 *	55 $\pm$ 1,8 *
<b>2</b>	63 $\pm$ 3,6 *	60 $\pm$ 1,2 *	59 $\pm$ 3,7 *	56 $\pm$ 4,2 *	45 $\pm$ 1,3 *	40 $\pm$ 2,7 *
<b>3</b>	70 $\pm$ 1,9 *	65 $\pm$ 1,3 *	55 $\pm$ 4,3 *	50 $\pm$ 1,1 *	45 $\pm$ 3,1 *	32 $\pm$ 5,8 *
<b>4</b>	60 $\pm$ 3,7 *	57 $\pm$ 3,3 *	55 $\pm$ 2,8 *	49 $\pm$ 1,7 *	37 $\pm$ 3,1 *	31 $\pm$ 2,5 *
<b>5</b>	59 $\pm$ 2,0 *	50 $\pm$ 2,5 *	46 $\pm$ 1,8 *	55 $\pm$ 1,6 *	40 $\pm$ 2,1 *	38 $\pm$ 3,7 *
<b>6</b>	65 $\pm$ 9,9 *	55 $\pm$ 0,4 *	43 $\pm$ 4,9 *	53 $\pm$ 8,7 *	42 $\pm$ 4,7 *	35 $\pm$ 6,0 *
<b>7</b>	68 $\pm$ 3,2 *	63 $\pm$ 3,8 *	53 $\pm$ 4,2 *	45 $\pm$ 8,4 *	43 $\pm$ 4,3 *	40 $\pm$ 4,9 *

Резултати су приказани као проценат пролиферације ћелија након 24, 48 и 72 сата третмана. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (100%))

Табела 6. IC<sub>50</sub> вредности испитиваних деривата хидантоина добијене након третмана MDA-MB-231 ћелија у различитим временским периодима

IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	24 h	48 h	72h
<b>0</b>	87 $\pm$ 0,2	45 $\pm$ 0,2	14 $\pm$ 0,03
<b>1</b>	> 100	> 100	78 $\pm$ 0,1
<b>2</b>	> 100	57 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 0,09
<b>3</b>	74 $\pm$ 0,1	19 $\pm$ 0,1	6 $\pm$ 0,1
<b>4</b>	21 $\pm$ 0,2	9 $\pm$ 0,2	0,90 $\pm$ 0,1
<b>5</b>	> 100	35 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,04
<b>6</b>	> 100	27 $\pm$ 0,1	1,20 $\pm$ 0,1
<b>7</b>	> 100	9 $\pm$ 0,1	3,70 $\pm$ 0,1

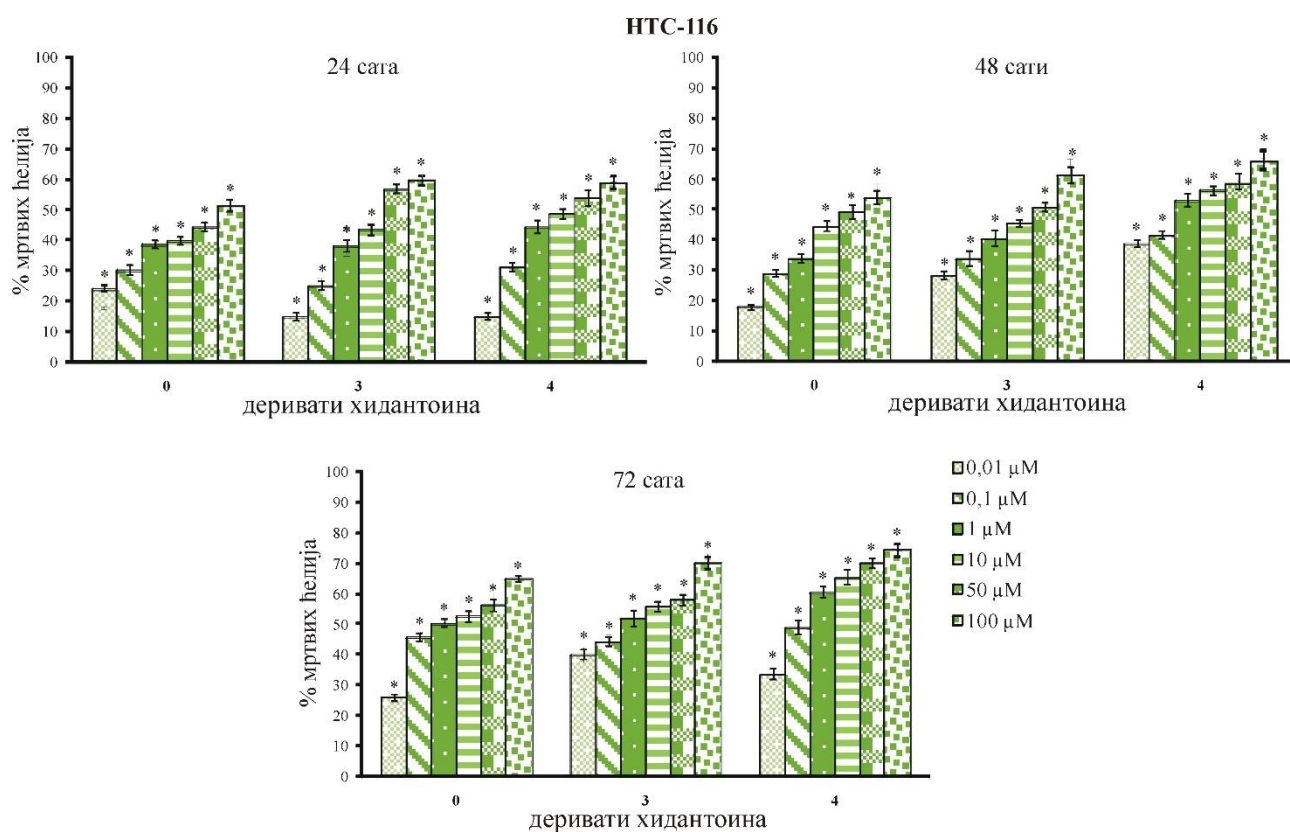
Ћелије су третиране различитим концентрацијама испитиваних деривата хиданотина током третмана у трајању од 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

### 4.3. Утицај испитиваних деривата хидантоина на активност лактат дехидрогеназе показатеља цитотоксичности

Као један од показатеља цитотоксичности, како ћелија тумора дебелог црева, НСТ-116 ћелијска линија, тако и тумора дојке, МДА-МВ-231 ћелијска линија, пратили смо активност ензима лактат дехидрогеназе истоименим тестом. Активност LDH ензима у супернатанту третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Ћелије су излагане третману током сва три испитивана временска интервала, у свих шест испитиваних концентрација одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**).

#### 4.3.1. Утицај испитиваних деривата хидантоина на активност лактат дехидрогеназе након третмана НСТ-116 ћелија

На **Графику 1** су приказане вредности LDH теста у сва три временска интервала за полазни хидантоин **0** и деривате **3** и **4** у свих шест испитиваних концентрација. Резултати указују да је проценат мртвих ћелија дозно зависан у све три испитиване временске тачке.



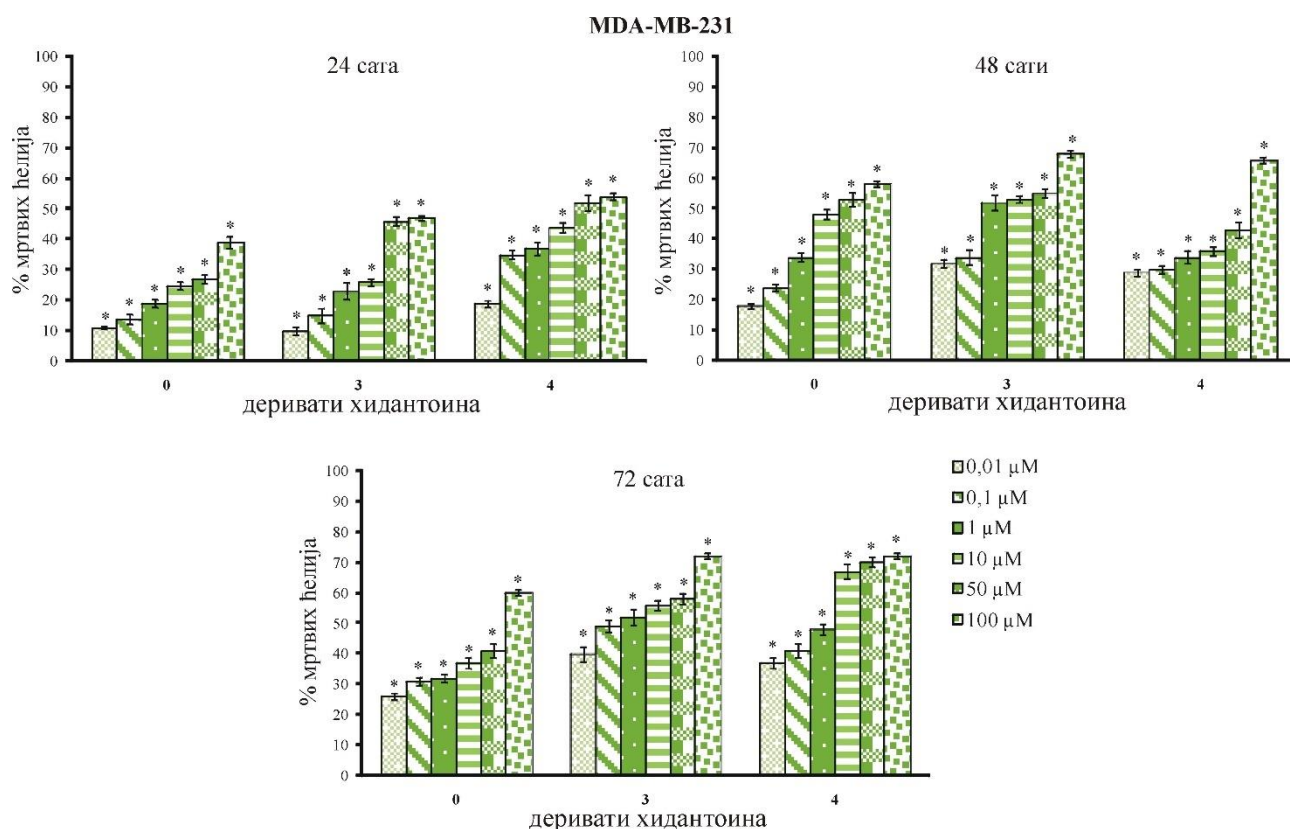
**График 1.** Процена цитотоксичног ефекта одабраних деривата хидантоина на НСТ-116 ћелијама одређена LDH тестом.

Резултати су приказани као проценат мртвих ћелија након третмана различитим концентрацијама одабраних деривата хидантоина у трајању од 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (0%))

Процент мртвих ћелија након 24 сата третмана дериватима **3** и **4** у концентрацији 0,01  $\mu\text{M}$  је био 17% и 16%. Након 48 сати третмана код сва три деривата забележен је израженији ефекат у односу на третман након 24 сата. Након продуженог третмана у трајању од 72 сата проценат мртвих ћелија се повећао и при концентрацији 0,01  $\mu\text{M}$  за дериват (**3**) је износио 39% и дериват (**4**) 31%, а при концентрацији 100  $\mu\text{M}$  проценат мртвих ћелија је био 67% и 71% за ова два испитивана деривата. Најјачи ефекат у свим испитиваним временским интервалима третмана остварио је дериват **4** и то у концентрацији 100  $\mu\text{M}$ .

#### 4.3.2. Утицај испитиваних деривата хидантоина на активност лактат дехидрогеназе након третмана MDA-MB-231 ћелија

На **Графику 2** су приказане вредности LDH теста за полазни хидантоин **0** и деривате хидантоина **3** и **4** у све три испитиване временске тачке третмана за свих шест концентрација. Резултати LDH теста указују да је проценат мртвих ћелија дозно зависан у сва три временска третмана за сва три одабрана хидантоина. Деривати **3** и **4** након сва три третмана имала су јачи ефекат у односу на једињење **0**.



**График 2.** Процена цитотоксичног ефекта одабраних деривата хидантоина на MDA-MB-231 ћелијама одређена LDH тестом.

Резултати су приказани као проценат мртвих ћелија након третмана различитим концентрацијама одабраних деривата хидантоина у трајању од 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (0%))

Процент мртвих ћелија након 24 сата третмана дериватима **3** и **4** у концентрацији 0,01  $\mu\text{M}$  је 10% и 19% док су одабрани деривати у концентрацији 100  $\mu\text{M}$  индуковали смрт код 47% (дериват **3**) односно 54% (дериват **4**) ћелија. Након 48 сати третмана за оба деривата забележен је сличан ефекат у односу на једињење **0**. С друге стране, након продуженог третмана у трајању од 72 сата проценат мртвих ћелија се повећао и при концентрацији 0,01  $\mu\text{M}$  за дериват **3** је износио 30% и дериват **4** је износио 37%, а при концентрацији 100  $\mu\text{M}$  проценат мртвих ћелија је био чак 72% за оба испитивана деривата.

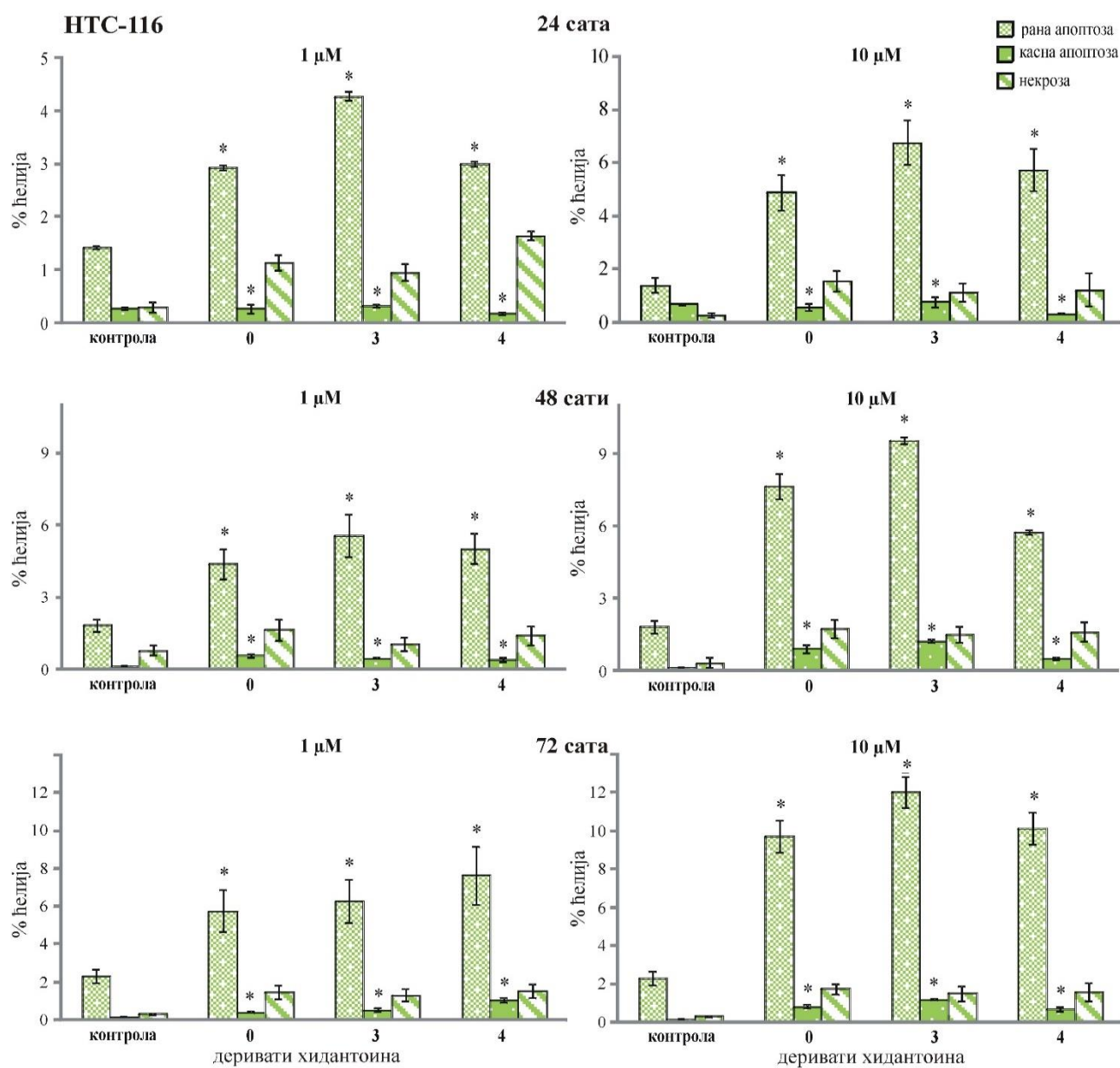
#### **4.4. Утицај испитиваних деривата хидантоина на индукцију апоптозе и застој у ћелијском циклусу**

Апоптоза је високо регулисан процес ћелијске смрти и кључна је за одржавање хомеостазе ткива, као и за спречавање туморогенезе. Дерегулација апоптотских механизма индикована је у великом броју дегенеративних болести, аутоимунских поремећаја, као и у туморогенези. Како је циљ ове дисертације испитивање потенцијалног антитуморског деловања деривата хидантоина, у овом делу студије је одређена њихова способност индукције апоптозе и застоја у ћелијском циклусу ћелија хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116 и хуманог тумора дојке, MDA-MB-231 ћелија.

##### **4.4.1. Утицај деривата хидантоина на индукцију апоптозе НСТ-116 ћелија**

Након испитивања цитотоксичног ефекта испитиваних деривата хидантоина МТТ и LDH тестом, испитан је тип ћелијске смрти који индукују одабрани деривати хидантоина применом Annexin V-FITC/7-AAD обележавања и детекцијом флуоресценце на проточном цитометру. У обе испитиване концентрације, сва три одабрана деривата хидантоина су показала статистички значајан про-апоптотски ефекат према НСТ-116 ћелијама који је дозно и временски зависан (**График 3**).

Третман одабраним дериватима хидантоина у обе испитиване концентрације у трајању 24 сата је показао значајан потенцијал за индукцију апоптозе јер је дошло до статистички значајног повећања процента НСТ-116 ћелија или у раној или у касној фази апоптозе у односу на проценат нетретираних (контролних) ћелија у апоптози. Важно је напоменути да је највећи број ћелија након свих третмана био у раној фази апоптозе. Исти тренд индукције апоптозе НСТ-116 ћелија одабрани деривати су задржали и при продуженом третману током 48 и 72 сата, с тим што је апсолутни број ћелија у апоптози био већи након 48 сати третмана у поређењу са 24 сата третмана, као и 72 сата у поређењу са 24 и 48 сати третмана. С друге стране, проценат ћелија након третмана одабраним дериватима хидантоина у обе концентрације и у сва три испитивана временска периода није био статистички значајно различит од процента нетретираних ћелија у некрози.



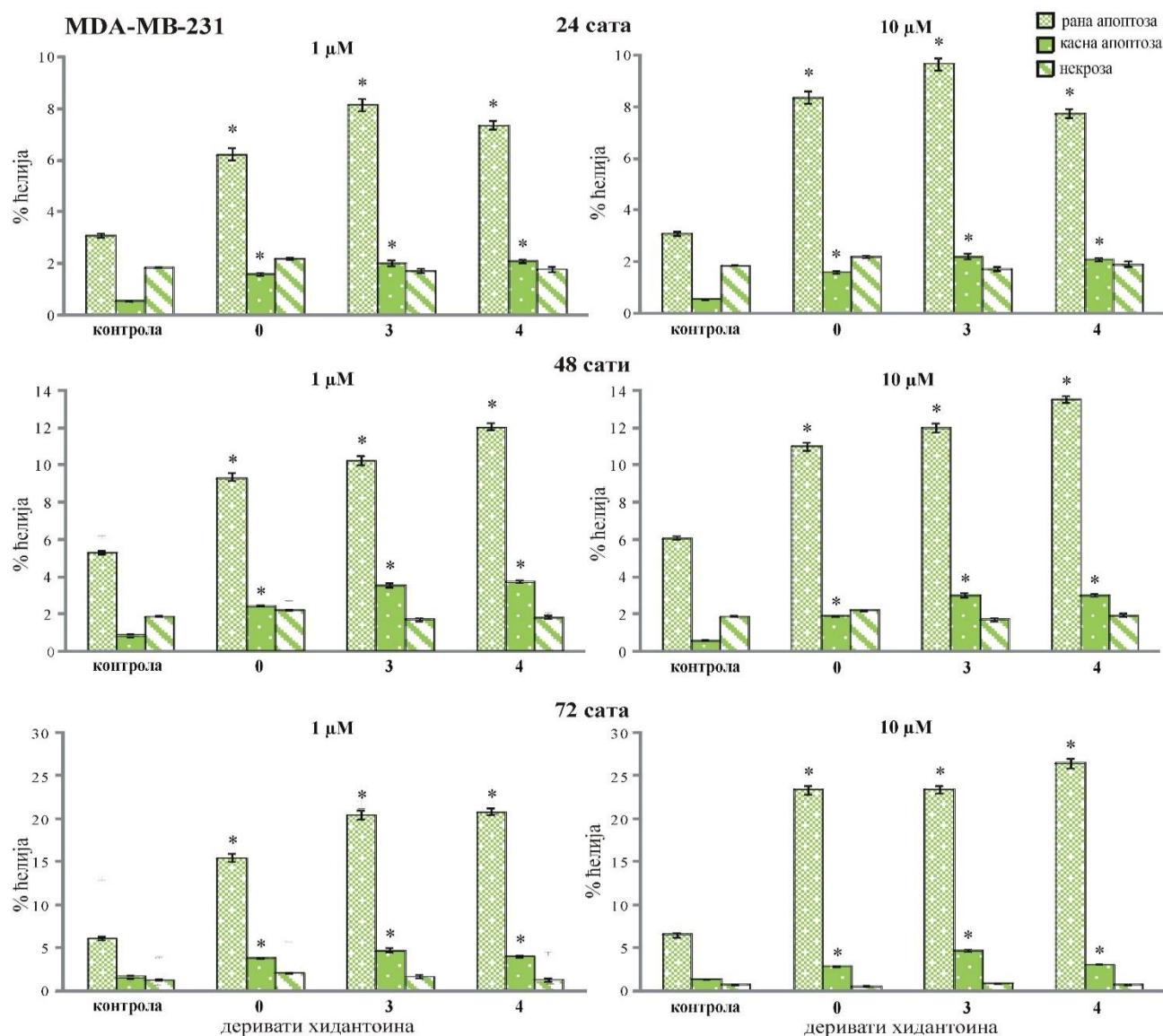
**График 3.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на дистрибуцију НСТ-116 ћелија у различитим фазама апоптозе и у некрози

Проточном цитометријом након обележавања Annexin V-FITC/7-AAD-ом је анализирана заступљеност НСТ-116 ћелија у раној фази апоптозе (Annexin-V-FITC (+)/7-AAD (-)), касној фази апоптозе (Annexin-V-FITC (+)/7-AAD (+)) и ћелија у некрози (Annexin-V-FITC (-)/7-AAD (+)). Ћелије су третиране током 24, 48 и 72 сата дериватима 0, 3 и 4 у две концентрације 1 μM и 10 μM. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)



#### 4.4.2. Утицај деривата хидантоина на индукцију апоптозе MDA-MB-231 ћелија

Тип ћелијске смрти индукован третманом одабраним дериватима хидантоина је детектован проточном цитометријом након обележавања ћелија Annexin V-FITC и 7-AAD бојом. MDA-MB-231 ћелије су третиране са одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** у обе испитиване концентрације током 24, 48 и 72 сата (График 4).



**График 4.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на дистрибуцију MDA-MB-231 ћелија у различитим фазама апоптозе и у некрози

Проточном цитометријом након обележавања Annexin V-FITC/7-AAD-ом је анализирана заступљеност MDA-MB-231 ћелија у раној фази апоптозе (Annexin-V-FITC (+)/7-AAD (-)), касној фази апоптозе (Annexin-V-FITC (+)/7-AAD (+)) и ћелија у некрози (Annexin-V-FITC (-)/7-AAD (+)). Ћелије су третиране током 24, 48 и 72 сата дериватима **0**, **3** и **4** у две концентрације 1 μM и 10 μM. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

Сва три испитивана деривата хидантоина у обе испитиване концентрације, су индуковала статистички значајно повећање апоптозе у MDA-MB-231 ћелијама након сва три времена третирања (24, 48 и 72 сата) у поређењу са процентом нетретираних (контролних) ћелија у апоптози. Временска и дозна зависност је изражена након третмана свим одабраним дериватима хидантоина. Процент ћелија у раној апоптози након краткотрајног третмана (24 сата) је највећи након третмана дериватом **3** при концентрацији 1  $\mu\text{M}$  износи 8,8% и при концентрацији 10  $\mu\text{M}$  износи 9,7%. Након продуженог третмана (48 и 72 сата) проценат ћелија у раној апоптози је највећи након третмана дериватом **4** у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  износи 12,2% (48 сати) и 20,5% (72 сата), док при концентрацији 10  $\mu\text{M}$  износи 13,5% (48 сати) и 26,5% (72 сата). Као и код третмана НСТ-116 ћелија, и након третмана MDA-MB-231 ћелија највећи број ћелија је био у раној фази апоптозе. С друге стране, проценат ћелија након третмана одабраним дериватима хидантоина у обе концентрације и у сва три испитивана временска периода није био статистички значајно различит од процента нетретираних ћелија у некрози. Такође, важно је истаћи да је апсолутни број ћелија у апоптози (и у раној и у касној фази) био већи након третмана MDA-MB-231 ћелија у поређењу са бројем НСТ-116 ћелија у апоптози након третмана одабраним дериватима хидантоина.

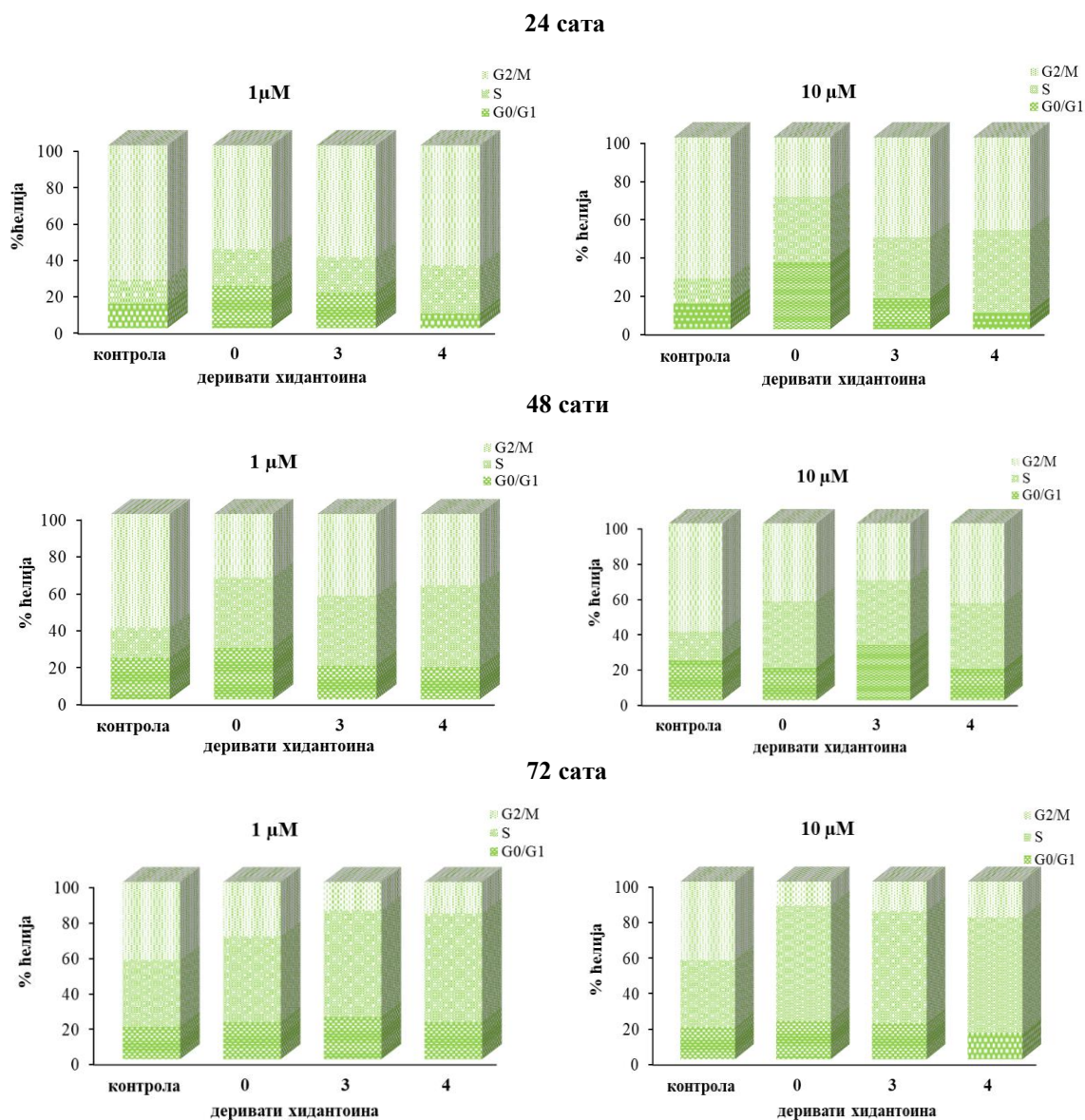
#### *4.4.3. Утицај деривата хидантоина на ћелијски циклус*

Ћелијски циклус и апоптоза су директно повезани. У оштећеним ћелијама деривати хидантоина могу изазвати заустављање ћелијског циклуса, које даје ћелијама време да активирају механизме поправке и санирају извесна оштећења. Уколико је сам баланс ћелијског циклуса нарушен и процес репарације није могућ, активира се програм апоптозе. Супротно томе, неконтролисано напредовање ћелијског циклуса и избегавање апоптозе су главне карактеристике туморских ћелија. С обзиром да је утицај апоптозе испитан, следећи корак је био да се одреди како одабрани деривати хидантоина утичу на дистрибуцију ћелија које се налазе у различитим фазама ћелијског циклуса. Ћелијске линије тумора дебелог црева, НСТ-116, и тумора дојке, MDA-MB-231, третиране су одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4**, као и приликом испитивања ефеката на индукцију апоптозе у две концентрације 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у сва три временска третмана. Обе ћелијске линије које су гајене само у хранљивом медијуму су коришћене као контролне нетретирание ћелије, а у циљу процене ефеката одабраних деривата хидантоина на дистрибуцију третираних туморских ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. За процену ћелијског циклуса коришћено је бојење ћелија пропидијум јодидом након чега је применом методе проточне цитометрије анализирали проценат ћелија које се налазе у G0/G1, S и G2/M фази.

##### *4.4.3.1. Утицај деривата хидантоина на ћелијски циклус НСТ-116 ћелија*

НСТ-116 ћелије су третиране дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у сва три временска интервала (**График 5**). Након култивације нетретираних НСТ-116 ћелија током 24 часа у тој популацији ћелија 74% ћелија се налазило у G2/M фази ћелијског циклуса и по 13% ћелија је у S и G0/G1 фази ћелијског циклуса. Третман одабраним дериватима хидантоина у обе испитиване концентрације током 24 сата је довео до повећања броја ћелија у S и G0/G1 фази ћелијског циклуса. Најзначајни ефекат је забележен након третмана дериватом **4** у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  када је више од 40% ћелија било у G0/G1 фази ћелијског циклуса. Након 48 сати третмана одабрани деривати хидантоина су довели до смањења броја ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, а повећања броја ћелија у S фази у

односу на број нетретираних ћелија у тим фазама циклуса након истог периода. Исти тренд је забележен и након 72 сата третмана, само је смањење и повећање броја у поменутиим фазама ћелијског циклуса било израженије.



**График 5.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на промене у ћелијском циклусу НСТ-116 ћелија

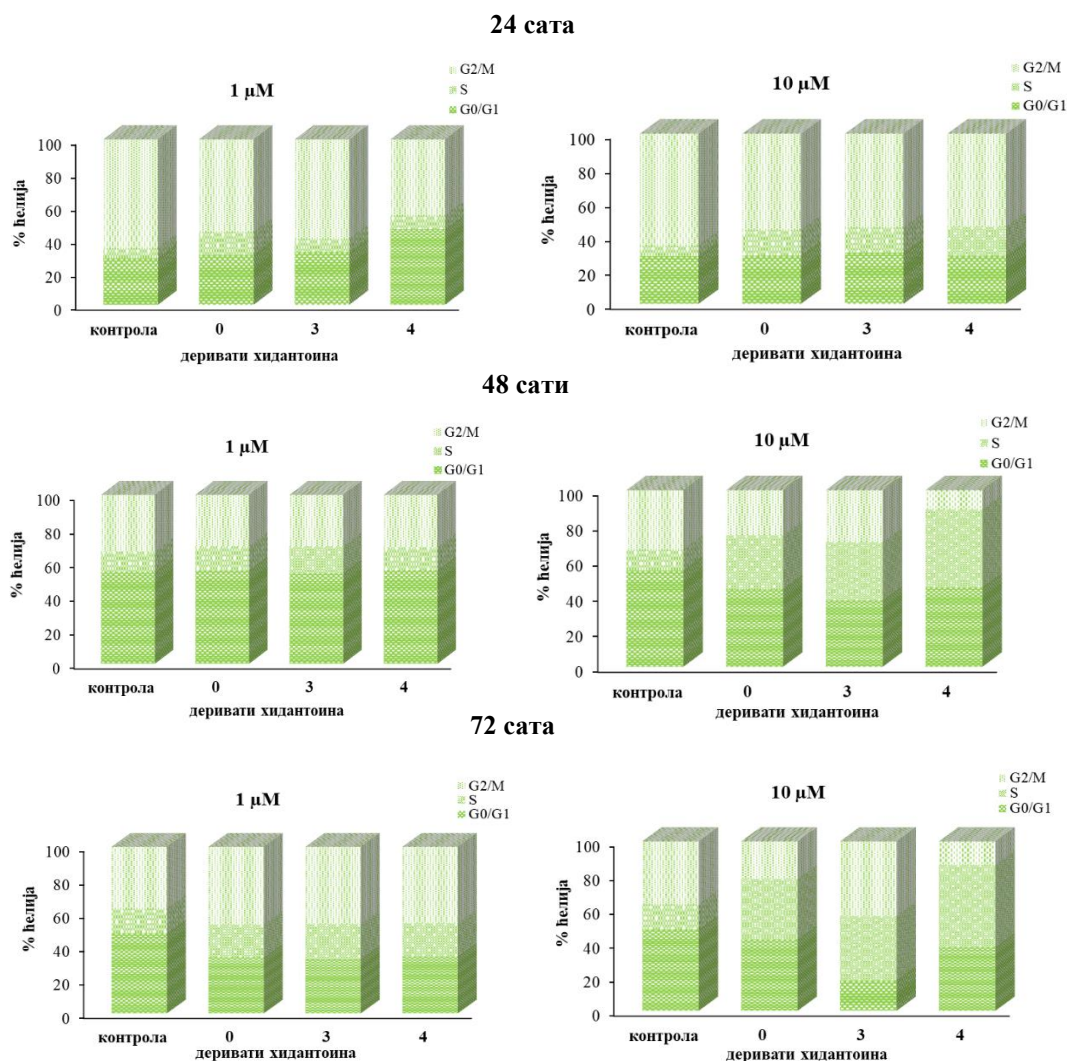
Ћелије су третиране током 24, 48 и 72 сата дериватима **0, 3 и 4** у две концентрације 1 μM и 10 μM. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

#### 4.4.3.2. Утицај деривата хидантоина на ћелијски циклус MDA-MB-231 ћелија

Деривати хидантоина изазивају заустављање ћелијског циклуса у ћелијским линијама тумора. MDA-MB-231 ћелије третиране су одабраним новосинтетисаним дериватима **0, 3 и 4** што је резултирало значајним повећањем процента ћелија у S фази. Ћелије су третиране са концентрацијама 1 μM и 10 μM у сва три временска интервала. Процент MDA-MB-231 ћелија у фази S ћелијског циклуса порастао је са 6% колико је детектовано код нетретираних



контролних ћелија до 7%, 8% и 13% након третмана у трајању 24 сата одабраним дериватима (**0**, **3** и **4**) при концентрацији 1  $\mu\text{M}$ . При концентрацији 10  $\mu\text{M}$  након истог третмана (24 сата) највећи пораст је забележен за дериват **4** (17% ћелија у S фази ћелијског циклуса). Након 48 сати третмана проценат ћелија у S фази ћелијског циклуса је највећи за дериват **4** при концентрацији 10  $\mu\text{M}$  (44%). Након третмана 72 сата у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  најачи ефекат је испољио дериват **3** (21%), док је у концентрацији 10  $\mu\text{M}$  најјачи ефекат остварио дериват **4** (48%).



**График 6.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на промене у ћелијском циклусу MDA-MB-231 ћелија.

Ћелије су третиране током 24, 48 и 72 сата дериватима **0**, **3** и **4** у две концентрације 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

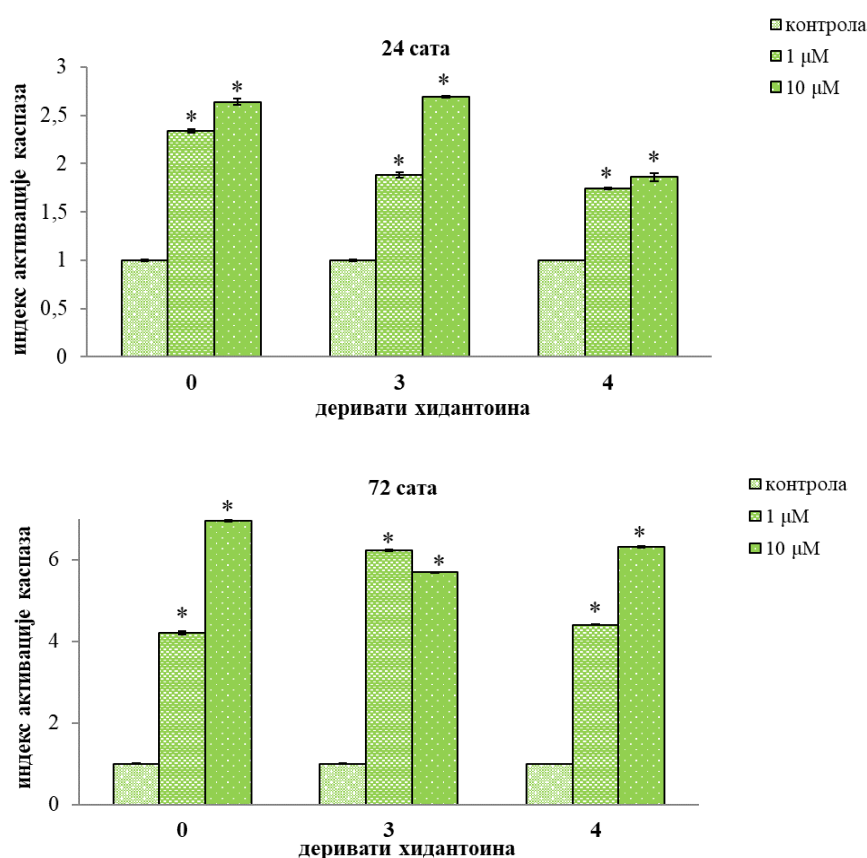
#### 4.4.4. Ефекти деривата хидантоина на активацију каспаза

Каспазе су главни егзекутори апоптозе. Како би се контролисала активација каспаза, оне се обично синтетишу као неактивни прекурсори, који се потом активирају у присуству различитих про-апоптотских сигнала. Активацију каспаза смо пратили током третмана ћелијске линије тумора дебелог црева, НСТ-116, и тумора дојке, MDA-MB-231, које су

третиране одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4**, у две концентрације 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у два временска третмана 24 и 72 сата.

#### 4.4.4.1. Ефекти одабраних деривата хидантоина на активацију каспаза у НСТ-116 ћелијама

НСТ-116 ћелије су третиране одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 24 и 72 сата. У обе испитиване концентрације, сва три деривата хидантоина су стимулисала активацију каспаза, што је детектовано повећањем Arostat флуоресцентног сигнала. Резултати су приказани на **Графику 7** и представљају активацију каспаза 24 и 72 сата након третмана.

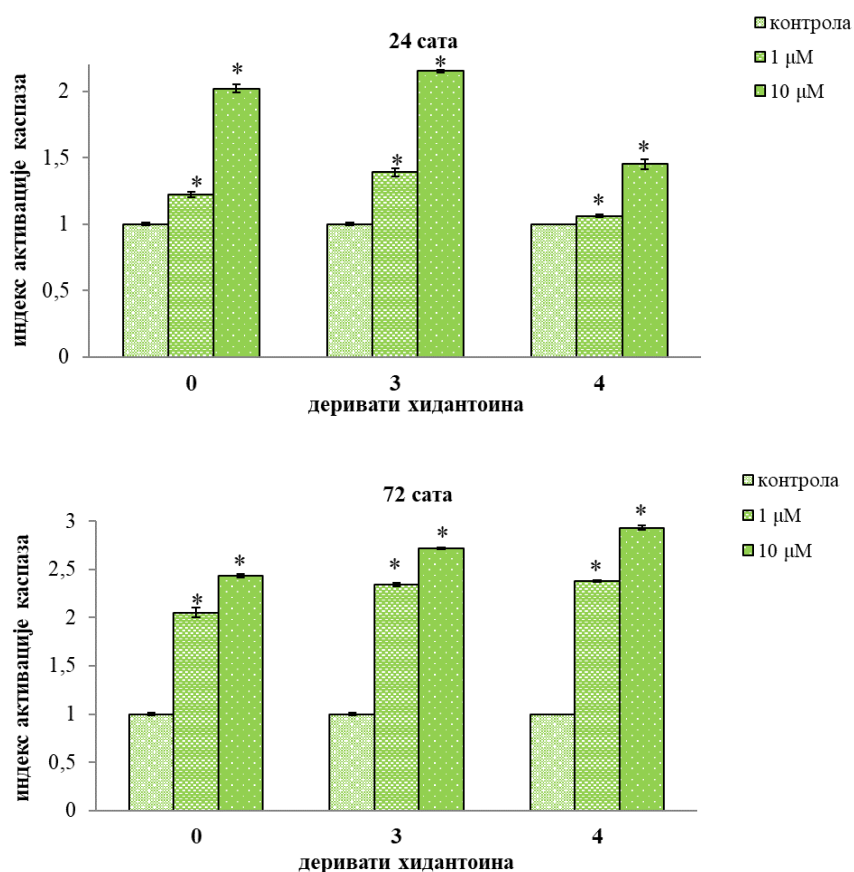


**График 7.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активност каспаза у НСТ-116 ћелијама

Ћелије су третиране са одабраним хидантоинима **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 24 и 72 сата. Резултати су приказани као индекс активације каспаза у односу на контролу која је 1, и као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама чији је индекс дефинисан као 1).

#### 4.4.4.2. Ефекти одабраних деривата хидантоина на активацију каспаза у MDA-MB-231 ћелијама

MDA-MB-231 ћелије су третиране одабраним дериватима **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 24 и 72 сата. У обе испитиване концентрације, сва три деривата хидантоина су довела до статистички значајног повећања активности каспаза мерено повећањем Arostat флуоресцентног сигнала. Резултати су приказани на **Графику 8** и представљају активацију каспаза у MDA-MB-231 ћелијама 24 и 72 сата након третмана.



**График 8.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активност каспаза у MDA-MB-231 ћелијама

Ћелије су третиране са одабраним хидантоинима **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1 μM и 10 μM током 24 и 72 сата. Резултати су приказани као индекс активације каспаза у односу на контролу која је 1, и као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама чији је индекс дефинисан као 1).

#### 4.5. Утицај испитиваних деривата хидантоина на продукцију реактивних врста кисеоника и азота од стране туморских ћелија

Оксидативни стрес индукује ћелијски дисбаланс, за који је утврђено да постоји у различитим ћелијама тумора, чинећи овај дисбаланс могућим онкогеним покретачем. Трајне модификације генетског материјала изазване „оксидативним оштећењима“ представљају први корак у процесу мутагенезе, туморогенезе и старења.

Азот оксид (NO), молекул који учествује у процесима апоптозе, ћелијског циклуса, прогресије тумора, ангиогенезе, и метастазе, детектован је и у зони између здравог и туморског ткива. Студије показују присуство NO у ткиву тумора, као и у туморском окружењу, васкуларним и стромалним ћелијама. Ефекат NO зависи од нивоа експресије индуцибилне азотоксид синтетазе (*iNOS*), временског присуства NO, микроокружења, генетске предиспозиције и типа ћелија.

#### 4.5.1. Продукција супероксид анјон радикала од стране НСТ-116 ћелија третираних дериватима хидантоина

У овој студији одређени су ефекти различитих концентрација испитиваних деривата хидантоина на продукцију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) од стране НСТ-116 ћелија након различитог трајања третмана. Добијени резултати су приказани у Табели 7 и показују да третман испитиваним дериватим хидантоина у свим испитиваним концентрацијама и свим испитиваним временским интервалима испољава значајан инхибиторни ефекат на продукцију  $O_2^{\cdot-}$  од стране НСТ-116 ћелија у поређењу са продукцијом од стране нетретираних ћелија. Смањена производња супероксид анјон радикала након третмана може бити укључена у експресију антипролиферативног ефекта ових једињења и њихове способности да индукују апоптозу. Сви испитивани деривати хидантоина су испољили антиоксидативни ефекат током сва три временска периода, а најачи ефекат је остварен третманом у трајању од 72 сата при концентрацији 100  $\mu$ M.

Табела 7. Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) од стране НСТ-116 ћелија.

Бр./Конц.	0 $\mu$ M	0,01 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>24h</b>							
0	100 ± 1,9	78 ± 1,8 *	75 ± 1,7 *	74 ± 2,7 *	69 ± 1,6 *	65 ± 2,5 *	59 ± 2,1 *
1	100 ± 1,9	76 ± 2,9 *	56 ± 1,50 *	53 ± 3,1 *	47 ± 2,4 *	49 ± 1,8 *	39 ± 1,6 *
2	100 ± 1,9	57 ± 1,5 *	49 ± 2,4 *	46 ± 1,6 *	45 ± 2,5 *	44 ± 1,4 *	44 ± 1,8 *
3	100 ± 1,9	74 ± 2,2 *	54 ± 2,5 *	46 ± 1,4 *	40 ± 1,4 *	39 ± 1,9 *	37 ± 2,3 *
4	100 ± 1,9	72 ± 2,7 *	70 ± 1,7 *	51 ± 1,5 *	40 ± 1,7 *	38 ± 1,3 *	35 ± 1,5 *
5	100 ± 1,9	63 ± 2,3 *	58 ± 2,1 *	56 ± 1,4 *	50 ± 1,5 *	49 ± 2,4 *	45 ± 1,3 *
6	100 ± 1,9	50 ± 1,1 *	45 ± 2,40 *	42 ± 2,2 *	41 ± 1,4 *	41 ± 1,8 *	39 ± 1,5 *
7	100 ± 1,9	65 ± 1,5 *	64 ± 2,6 *	63 ± 1,3 *	52 ± 2,5 *	43 ± 2,3 *	42 ± 2,3 *
<b>48 h</b>							
0	85 ± 1,5	70 ± 1,7 *	67 ± 1,9 *	65 ± 2,1 *	62 ± 1,3 *	60 ± 2,4 *	50 ± 1,7 *
1	85 ± 1,5	68 ± 3,0 *	55 ± 2,5 *	55 ± 2,4 *	53 ± 1,7 *	49 ± 1,8 *	44 ± 2,6 *
2	85 ± 1,5	48 ± 2,2 *	47 ± 2,6 *	47 ± 2,5 *	47 ± 1,5 *	43 ± 2,1 *	45 ± 1,5 *
3	85 ± 1,5	61 ± 1,9 *	54 ± 1,9 *	52 ± 2,3 *	50 ± 1,9 *	48 ± 1,9 *	35 ± 2,4 *
4	85 ± 1,5	75 ± 1,5 *	68 ± 3,6 *	66 ± 2,6 *	65 ± 2,4 *	64 ± 1,7 *	33 ± 2,1 *
5	85 ± 1,5	75 ± 2,5 *	72 ± 1,7 *	68 ± 1,3 *	66 ± 2,5 *	55 ± 2,4 *	49 ± 3,2 *
6	85 ± 1,5	71 ± 1,2 *	70 ± 2,3 *	61 ± 2,9 *	58 ± 1,8 *	57 ± 2,3 *	56 ± 2,9 *
7	85 ± 1,5	75 ± 1,5 *	71 ± 1,7 *	65 ± 2,3 *	64 ± 3,1 *	47 ± 2,5 *	45 ± 2,3 *
<b>72 h</b>							
0	79 ± 2,3	58 ± 2,4 *	57 ± 1,3 *	50 ± 3,2 *	43 ± 2,1 *	41 ± 2,1 *	38 ± 1,5 *
1	79 ± 2,3	57 ± 3,0 *	55 ± 2,4 *	49 ± 2,5 *	47 ± 3,1 *	46 ± 3,0 *	35 ± 2,2 *
2	79 ± 2,3	63 ± 2,6 *	62 ± 2,2 *	55 ± 2,2 *	51 ± 1,8 *	50 ± 2,5 *	47 ± 1,9 *
3	79 ± 2,3	64 ± 2,9 *	50 ± 0,9 *	43 ± 2,4 *	39 ± 2,5 *	39 ± 3,2 *	34 ± 2,1 *
4	79 ± 2,3	65 ± 2,5 *	62 ± 3,2 *	60 ± 3,2 *	48 ± 3,1 *	37 ± 1,5 *	32 ± 3,4 *
5	79 ± 2,3	69 ± 2,8 *	67 ± 1,8 *	58 ± 3,0 *	54 ± 2,6 *	46 ± 2,8 *	40 ± 3,1 *
6	79 ± 2,3	47 ± 3,1 *	73 ± 2,2 *	39 ± 3,1 *	38 ± 1,9 *	36 ± 2,4 *	35 ± 2,5 *
7	79 ± 2,3	71 ± 2,7 *	70 ± 1,1 *	63 ± 2,3 *	62 ± 3,2 *	58 ± 3,1 *	53 ± 2,8 *

Концентрација продукованог супероксид анјон радикала је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

#### 4.5.2. Продукција супероксид анјон радикала од стране MDA-MB-231 ћелија третираних дериватима хидантоина

У Табели 8 приказани су ефекти различитих концентрација деривата хидантоина на продукцију супероксид анјон радикала од стране MDA-MB-231 ћелија након различитог трајања третмана. Приказани резултати указују да третман свим испитиваним дериватима хидантоина у свим испитиваним концентрацијама и свим испитиваним временским интервалима изазива значајан инхибиторни ефекат на продукцију  $O_2^{\cdot-}$  од стране MDA-MB-231 ћелија у поређењу са продукцијом од стране нетретираних ћелија.

**Табела 8.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) од стране MDA-MB-231 ћелија

Бр./Конц.	0 $\mu$ M	0,01 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>24h</b>							
0	92 $\pm$ 0,2	80 $\pm$ 1,9 *	75 $\pm$ 2,1 *	68 $\pm$ 1,4 *	61 $\pm$ 2,1 *	50 $\pm$ 1,5 *	39 $\pm$ 2,0 *
1	92 $\pm$ 0,2	79 $\pm$ 3,2 *	73 $\pm$ 2,5 *	58 $\pm$ 3,2 *	51 $\pm$ 1,8 *	46 $\pm$ 2,1 *	40 $\pm$ 1,6 *
2	92 $\pm$ 0,2	76 $\pm$ 1,2 *	61 $\pm$ 1,9 *	56 $\pm$ 1,8 *	54 $\pm$ 2,3 *	50 $\pm$ 3,0 *	47 $\pm$ 2,7 *
3	92 $\pm$ 0,2	85 $\pm$ 1,5 *	62 $\pm$ 2,6 *	58 $\pm$ 2,8 *	53 $\pm$ 1,6 *	46 $\pm$ 1,9 *	43 $\pm$ 3,2 *
4	92 $\pm$ 0,2	69 $\pm$ 2,6 *	59 $\pm$ 3,7 *	49 $\pm$ 3,7 *	43 $\pm$ 3,1 *	40 $\pm$ 3,6 *	31 $\pm$ 2,5 *
5	92 $\pm$ 0,2	70 $\pm$ 3,2 *	52 $\pm$ 1,8 *	47 $\pm$ 3,8 *	42 $\pm$ 3,4 *	41 $\pm$ 2,8 *	38 $\pm$ 1,3 *
6	92 $\pm$ 0,2	60 $\pm$ 2,7 *	50 $\pm$ 3,8 *	48 $\pm$ 3,0 *	47 $\pm$ 3,2 *	45 $\pm$ 1,8 *	43 $\pm$ 2,1 *
7	92 $\pm$ 0,2	78 $\pm$ 3,6 *	62 $\pm$ 2,3 *	49 $\pm$ 1,7 *	45 $\pm$ 2,7 *	41 $\pm$ 2,6 *	38 $\pm$ 2,3 *
<b>48 h</b>							
0	77 $\pm$ 1,2	65 $\pm$ 1,9 *	61 $\pm$ 2,5 *	58 $\pm$ 1,7 *	42 $\pm$ 1,3 *	40 $\pm$ 2,4 *	35 $\pm$ 1,7 *
1	77 $\pm$ 1,2	61 $\pm$ 1,6 *	52 $\pm$ 2,0 *	50 $\pm$ 1,0 *	48 $\pm$ 1,6 *	47 $\pm$ 4,6 *	39 $\pm$ 4,5 *
2	77 $\pm$ 1,2	49 $\pm$ 2,0 *	44 $\pm$ 2,2 *	43 $\pm$ 1,2 *	42 $\pm$ 1,5 *	41 $\pm$ 0,5 *	40 $\pm$ 2,0 *
3	77 $\pm$ 1,2	55 $\pm$ 2,6 *	55 $\pm$ 3,6 *	50 $\pm$ 2,6 *	47 $\pm$ 0,8 *	44 $\pm$ 1,2 *	41 $\pm$ 3,3 *
4	77 $\pm$ 1,2	70 $\pm$ 0,8 *	68 $\pm$ 1,3 *	61 $\pm$ 1,0 *	59 $\pm$ 2,3 *	48 $\pm$ 1,3 *	30 $\pm$ 0,5 *
5	77 $\pm$ 1,2	68 $\pm$ 3,0 *	65 $\pm$ 2,8 *	62 $\pm$ 1,4 *	60 $\pm$ 1,9 *	50 $\pm$ 1,4 *	35 $\pm$ 1,1 *
6	77 $\pm$ 1,2	65 $\pm$ 2,3 *	64 $\pm$ 2,1 *	55 $\pm$ 3,6 *	51 $\pm$ 3,5 *	45 $\pm$ 2,9 *	40 $\pm$ 3,1 *
7	77 $\pm$ 1,2	65 $\pm$ 1,7 *	69 $\pm$ 1,9 *	60 $\pm$ 2,5 *	58 $\pm$ 2,7 *	40 $\pm$ 2,0 *	36 $\pm$ 2,3 *
<b>72 h</b>							
0	69 $\pm$ 1,8	60 $\pm$ 3,5 *	51 $\pm$ 2,9 *	48 $\pm$ 3,1 *	43 $\pm$ 2,4 *	40 $\pm$ 2,4 *	30 $\pm$ 2,7 *
1	69 $\pm$ 1,8	58 $\pm$ 3,5 *	50 $\pm$ 5,3 *	43 $\pm$ 4,2 *	40 $\pm$ 3,9 *	35 $\pm$ 3,1 *	31 $\pm$ 2,9 *
2	69 $\pm$ 1,8	55 $\pm$ 3,3 *	53 $\pm$ 2,5 *	48 $\pm$ 1,2 *	40 $\pm$ 2,2 *	38 $\pm$ 5,0 *	35 $\pm$ 4,8 *
3	69 $\pm$ 1,8	59 $\pm$ 2,4 *	48 $\pm$ 4,8 *	43 $\pm$ 3,8 *	39 $\pm$ 0,6 *	34 $\pm$ 3,5 *	33 $\pm$ 5,1 *
4	69 $\pm$ 1,8	56 $\pm$ 1,8 *	52 $\pm$ 2,8 *	46 $\pm$ 5,1 *	42 $\pm$ 3,4 *	32 $\pm$ 5,1 *	28 $\pm$ 3,1 *
5	69 $\pm$ 1,8	62 $\pm$ 2,7 *	60 $\pm$ 1,6 *	59 $\pm$ 3,9 *	50 $\pm$ 5,2 *	47 $\pm$ 4,1 *	34 $\pm$ 3,7 *
6	69 $\pm$ 1,8	64 $\pm$ 0,4 *	57 $\pm$ 1,9 *	48 $\pm$ 5,6 *	45 $\pm$ 4,2 *	42 $\pm$ 2,9 *	37 $\pm$ 3,3 *
7	69 $\pm$ 1,8	62 $\pm$ 2,8 *	54 $\pm$ 3,5 *	50 $\pm$ 0,8 *	46 $\pm$ 5,3 *	40 $\pm$ 2,7 *	32 $\pm$ 4,0 *

Концентрација продукваног супероксид анјон радикала је изражена у nmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

Смањена производња супероксид анјон радикала након третмана може бити један од механизма забележеног антипролиферативног ефекта испитиваних деривата хидантоина и њихове способности да индукују апоптозу као што је уочено и код НСТ-116 ћелија. Антиоксидативни ефекат током сва три временска третмана, показала су сва испитивана

једињења, а најјачи ефекат је остварен након третмана од 72 сата. Дериват 4 је у сва три временска интервала имао најјачи антиоксидативни ефекат и показао је како дозну тако и временску зависност.

#### 4.5.3. Продукција азот оксида од стране НСТ-116 ћелија третираних дериватима хидантоина

Подаци приказани у Табели 9 представљају концентрацију нитрита (индиректног показатеља продукције кратко живећег NO) у супернатанту НСТ-116 ћелија инкубираних у присуству тестираних деривата хидантоина у различитим концентарцијама након третмана у трајању 24, 48 и 72 сата.

Табела 9. Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију азот оксида од стране НСТ-116 ћелија

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24h</b>							
0	24 $\pm$ 1,1	28 $\pm$ 2,6 *	30 $\pm$ 1,1 *	32 $\pm$ 2,7 *	34 $\pm$ 2,1 *	38 $\pm$ 2,3 *	39 $\pm$ 1,5 *
1	24 $\pm$ 1,1	31 $\pm$ 2,3 *	34 $\pm$ 2,0 *	43 $\pm$ 2,4 *	44 $\pm$ 2,7 *	46 $\pm$ 0,9 *	53 $\pm$ 1,0 *
2	24 $\pm$ 1,1	37 $\pm$ 0,5 *	43 $\pm$ 1,9 *	44 $\pm$ 0,8 *	45 $\pm$ 0,9 *	46 $\pm$ 3,6 *	58 $\pm$ 1,8 *
3	24 $\pm$ 1,1	45 $\pm$ 3,0 *	48 $\pm$ 0,8 *	49 $\pm$ 3,7 *	54 $\pm$ 5,9 *	59 $\pm$ 2,9 *	60 $\pm$ 4,8 *
4	24 $\pm$ 1,1	31 $\pm$ 2,3 *	34 $\pm$ 1,9 *	38 $\pm$ 0,7 *	41 $\pm$ 0,6 *	43 $\pm$ 1,1 *	43 $\pm$ 0,8 *
5	24 $\pm$ 1,1	33 $\pm$ 0,8 *	33 $\pm$ 3,1 *	35 $\pm$ 1,9 *	35 $\pm$ 2,8 *	47 $\pm$ 3,1 *	58 $\pm$ 1,7 *
6	24 $\pm$ 1,1	29 $\pm$ 0,9 *	31 $\pm$ 1,3 *	31 $\pm$ 0,8 *	32 $\pm$ 1,9 *	33 $\pm$ 2,2 *	33 $\pm$ 2,0 *
7	24 $\pm$ 1,1	37 $\pm$ 0,4 *	44 $\pm$ 1,5 *	45 $\pm$ 2,6 *	46 $\pm$ 2,2 *	49 $\pm$ 3,6 *	51 $\pm$ 2,7 *
<b>48 h</b>							
0	33 $\pm$ 1,3	40 $\pm$ 2,3 *	46 $\pm$ 1,4 *	47 $\pm$ 2,2 *	48 $\pm$ 2,4 *	53 $\pm$ 1,80 *	54 $\pm$ 2,1 *
1	33 $\pm$ 1,3	42 $\pm$ 3,1 *	44 $\pm$ 4,1 *	45 $\pm$ 1,9 *	46 $\pm$ 2,8 *	49 $\pm$ 2,10 *	64 $\pm$ 3,9 *
2	33 $\pm$ 1,3	50 $\pm$ 1,1 *	57 $\pm$ 2,8 *	62 $\pm$ 2,2 *	64 $\pm$ 2,7 *	68 $\pm$ 2,10 *	70 $\pm$ 3,2 *
3	33 $\pm$ 1,3	39 $\pm$ 0,8 *	44 $\pm$ 2,7 *	46 $\pm$ 3,1 *	48 $\pm$ 2,4 *	51 $\pm$ 3,20 *	60 $\pm$ 2,6 *
4	33 $\pm$ 1,3	60 $\pm$ 2,3 *	61 $\pm$ 3,1 *	66 $\pm$ 4,2 *	67 $\pm$ 2,5 *	69 $\pm$ 1,70 *	71 $\pm$ 3,1 *
5	33 $\pm$ 1,3	58 $\pm$ 4,8 *	64 $\pm$ 2,7 *	69 $\pm$ 1,9 *	70 $\pm$ 1,2 *	71 $\pm$ 2,40 *	70 $\pm$ 2,2 *
6	33 $\pm$ 1,3	47 $\pm$ 2,1 *	49 $\pm$ 3,3 *	50 $\pm$ 1,2 *	54 $\pm$ 3,5 *	55 $\pm$ 3,10 *	69 $\pm$ 1,1 *
7	33 $\pm$ 1,3	54 $\pm$ 1,5 *	61 $\pm$ 2,4 *	66 $\pm$ 3,3 *	69 $\pm$ 3,1 *	70 $\pm$ 2,40 *	70 $\pm$ 1,9 *
<b>72 h</b>							
0	40 $\pm$ 1,7	50 $\pm$ 1,9 *	56 $\pm$ 2,3 *	62 $\pm$ 1,5 *	64 $\pm$ 1,8 *	66 $\pm$ 2,4 *	68 $\pm$ 1,4 *
1	40 $\pm$ 1,7	55 $\pm$ 1,7 *	57 $\pm$ 0,9 *	59 $\pm$ 2,1 *	61 $\pm$ 1,2 *	62 $\pm$ 0,8 *	66 $\pm$ 2,5 *
2	40 $\pm$ 1,7	79 $\pm$ 2,6 *	93 $\pm$ 1,5 *	94 $\pm$ 1,6 *	96 $\pm$ 1,3 *	111 $\pm$ 2,1 *	114 $\pm$ 1,6 *
3	40 $\pm$ 1,7	63 $\pm$ 2,8 *	73 $\pm$ 1,9 *	75 $\pm$ 2,7 *	78 $\pm$ 2,8 *	91 $\pm$ 1,6 *	95 $\pm$ 1,7 *
4	40 $\pm$ 1,7	62 $\pm$ 1,7 *	69 $\pm$ 2,4 *	72 $\pm$ 2,3 *	76 $\pm$ 1,6 *	86 $\pm$ 2,3 *	114 $\pm$ 2,1 *
5	40 $\pm$ 1,7	62 $\pm$ 1,4 *	76 $\pm$ 1,5 *	78 $\pm$ 2,1 *	80 $\pm$ 2,3 *	89 $\pm$ 1,2 *	108 $\pm$ 1,6 *
6	40 $\pm$ 1,7	58 $\pm$ 1,9 *	66 $\pm$ 1,6 *	68 $\pm$ 1,3 *	70 $\pm$ 1,8 *	72 $\pm$ 1,9 *	92 $\pm$ 1,7 *
7	40 $\pm$ 1,7	63 $\pm$ 2,8 *	71 $\pm$ 1,7 *	76 $\pm$ 1,6 *	77 $\pm$ 0,9 *	115 $\pm$ 1,1 *	111 $\pm$ 1,2 *

Концентрација нитрита измерена у супернатантима је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

Третман свим дериватима хидантоина је довео до значајног пораст производње NO од стране НСТ-116 ћелија, индиректно мерен нивоом нитрита, у односу на ниво нитрита у

контролним нетретираним ћелијама. Најјачи ефекат показао је дериват **3** и то након 24 сата третмана, док је 48 и 72 сата након третмана најјачи ефекат остварио дериват **4** у концентрацији 100  $\mu\text{M}$ .

#### 4.5.4. Продукција азот оксида од стране MDA-MB-231 ћелија третираних дериватима хидантоина

Приказани подаци у Табели 10 представљају концентрацију нитрита у MDA-MB-231 ћелијама третираних испитиваним дериватима хидантоина у свих шест испитиваних концентрација 24, 48 и 72 сата након третмана.

Табела 10. Ефекат испитиваних деривата хидантоина на продукцију азот оксида од стране MDA-MB-231 ћелија

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24h</b>							
<b>0</b>	15 $\pm$ 0,8	18 $\pm$ 0,6 *	20 $\pm$ 0,9 *	21 $\pm$ 0,5 *	24 $\pm$ 0,4 *	26 $\pm$ 0,5 *	28 $\pm$ 0,9 *
<b>1</b>	15 $\pm$ 0,8	19 $\pm$ 0,2 *	24 $\pm$ 0,5 *	28 $\pm$ 0,6 *	29 $\pm$ 1,2 *	32 $\pm$ 0,6 *	35 $\pm$ 2,1 *
<b>2</b>	15 $\pm$ 0,8	18 $\pm$ 1,3 *	20 $\pm$ 0,7 *	21 $\pm$ 0,7 *	25 $\pm$ 0,2 *	35 $\pm$ 1,5 *	43 $\pm$ 0,6 *
<b>3</b>	15 $\pm$ 0,8	17 $\pm$ 0,5 *	18 $\pm$ 0,4 *	19 $\pm$ 0,8 *	20 $\pm$ 0,5 *	38 $\pm$ 0,4 *	45 $\pm$ 1,2 *
<b>4</b>	15 $\pm$ 0,8	18 $\pm$ 0,5 *	20 $\pm$ 0,5 *	22 $\pm$ 0,9 *	25 $\pm$ 0,9 *	27 $\pm$ 0,1 *	29 $\pm$ 0,5 *
<b>5</b>	15 $\pm$ 0,8	16 $\pm$ 1,2 *	19 $\pm$ 0,5 *	21 $\pm$ 0,3 *	25 $\pm$ 0,4 *	26 $\pm$ 0,8 *	28 $\pm$ 0,1 *
<b>6</b>	15 $\pm$ 0,8	19 $\pm$ 0,3 *	22 $\pm$ 0,7 *	25 $\pm$ 0,6 *	28 $\pm$ 0,9 *	30 $\pm$ 1,1 *	32 $\pm$ 1,1 *
<b>7</b>	15 $\pm$ 0,8	16 $\pm$ 0,7 *	17 $\pm$ 0,1 *	18 $\pm$ 0,2 *	20 $\pm$ 0,1 *	25 $\pm$ 0,1 *	30 $\pm$ 0,2 *
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	28 $\pm$ 1,3	30 $\pm$ 0,4 *	35 $\pm$ 0,8 *	39 $\pm$ 0,5 *	42 $\pm$ 0,4 *	45 $\pm$ 0,5 *	49 $\pm$ 0,9 *
<b>1</b>	28 $\pm$ 1,3	33 $\pm$ 0,3 *	39 $\pm$ 0,1 *	40 $\pm$ 0,5 *	43 $\pm$ 0,5 *	48 $\pm$ 0,3 *	52 $\pm$ 0,3 *
<b>2</b>	28 $\pm$ 1,3	34 $\pm$ 0,6 *	41 $\pm$ 0,5 *	45 $\pm$ 0,3 *	49 $\pm$ 0,1 *	52 $\pm$ 0,1 *	58 $\pm$ 0,7 *
<b>3</b>	28 $\pm$ 1,3	35 $\pm$ 1,1 *	39 $\pm$ 0,2 *	44 $\pm$ 0,6 *	50 $\pm$ 0,3 *	57 $\pm$ 0,4 *	60 $\pm$ 0,8 *
<b>4</b>	28 $\pm$ 1,3	31 $\pm$ 0,2 *	37 $\pm$ 0,4 *	43 $\pm$ 0,4 *	48 $\pm$ 1,3 *	50 $\pm$ 0,6 *	53 $\pm$ 0,9 *
<b>5</b>	28 $\pm$ 1,3	33 $\pm$ 0,7 *	35 $\pm$ 0,7 *	39 $\pm$ 0,1 *	45 $\pm$ 0,7 *	47 $\pm$ 0,5 *	50 $\pm$ 0,6 *
<b>6</b>	28 $\pm$ 1,3	30 $\pm$ 0,4 *	35 $\pm$ 1,1 *	40 $\pm$ 0,9 *	43 $\pm$ 0,4 *	49 $\pm$ 0,3 *	55 $\pm$ 0,5 *
<b>7</b>	28 $\pm$ 1,3	37 $\pm$ 0,2 *	40 $\pm$ 0,2 *	45 $\pm$ 0,4 *	47 $\pm$ 0,6 *	50 $\pm$ 0,2 *	59 $\pm$ 0,2 *
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	31 $\pm$ 1,1	35 $\pm$ 2,2 *	40 $\pm$ 2,1 *	44 $\pm$ 1,9 *	49 $\pm$ 2,5 *	58 $\pm$ 0,9 *	69 $\pm$ 1,3 *
<b>1</b>	31 $\pm$ 1,1	40 $\pm$ 0,4 *	47 $\pm$ 1,9 *	52 $\pm$ 0,7 *	58 $\pm$ 0,8 *	66 $\pm$ 3,6 *	73 $\pm$ 1,7 *
<b>2</b>	31 $\pm$ 1,1	38 $\pm$ 2,5 *	40 $\pm$ 0,4 *	43 $\pm$ 2,1 *	50 $\pm$ 1,8 *	75 $\pm$ 3,7 *	78 $\pm$ 3,9 *
<b>3</b>	31 $\pm$ 1,1	35 $\pm$ 1,9 *	37 $\pm$ 1,9 *	50 $\pm$ 0,6 *	62 $\pm$ 0,5 *	71 $\pm$ 1,1 *	79 $\pm$ 0,9 *
<b>4</b>	31 $\pm$ 1,1	36 $\pm$ 0,8 *	45 $\pm$ 1,8 *	49 $\pm$ 1,9 *	51 $\pm$ 2,7 *	58 $\pm$ 3,2 *	66 $\pm$ 1,7 *
<b>5</b>	31 $\pm$ 1,1	32 $\pm$ 0,9 *	35 $\pm$ 1,3 *	43 $\pm$ 0,3 *	55 $\pm$ 1,9 *	63 $\pm$ 2,2 *	71 $\pm$ 2,0 *
<b>6</b>	31 $\pm$ 1,1	39 $\pm$ 0,2 *	49 $\pm$ 1,5 *	51 $\pm$ 2,5 *	67 $\pm$ 2,2 *	70 $\pm$ 3,6 *	77 $\pm$ 2,7 *
<b>7</b>	31 $\pm$ 1,1	39 $\pm$ 2,3 *	42 $\pm$ 2,0 *	45 $\pm$ 1,4 *	50 $\pm$ 2,6 *	63 $\pm$ 0,8 *	79 $\pm$ 1,0 *

Концентрација нитрита измерена у супернатантима је изражена у  $\text{nmol/ml}$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

Сва једињења су довела до значајног повећања продукције NO од стране MDA-MB-231 ћелија мерено концентрацијом нитрита у односу на ниво продукованог NO од стране

нетретираних (контролних) ћелија. Најјачи ефекат је показао дериват **3** у концентрацији 100  $\mu\text{M}$  након 24 сата третмана, као и након продужених третмана у трајању 48 и 72 сата.

#### 4.6. Утицај испитиваних деривата хидантоина на ниво тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона продукованог од стране туморских ћелија

Многе студије су показале да антиоксиданси могу да заштите здрава ткива од оштећења током хемиотерапије, а да несмање саму антитуморску ефикасност. С друге стране, одређени антиоксиданси могу да појачају цитотоксичне ефекте, поспешујући деловање хемиотерапеутика на тумор. Концентрација тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона након третмана туморских ћелија испитиваним дериватима хидантоина у различитим концентрацијама у трајању 24, 48 и 72 сата се значајно променила, забележено је повећање тоталног и редукованог глутатиона у поређењу са нивоом код контролних нетретираних ћелија, док се ниво оксидованог глутатиона смањило у односу на контролне нетретиране ћелије.

##### 4.6.1. Ниво тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона у НСТ-116 ћелијама третираним дериватима хидантоина

Табела 11. Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво тоталног глутатиона у НСТ-116 ћелијама

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24 h</b>							
<b>0</b>	8,23 $\pm$ 1,1	10,30 $\pm$ 1,9 *	10,09 $\pm$ 1,8 *	9,80 $\pm$ 1,3 *	9,38 $\pm$ 1,8 *	9,21 $\pm$ 2,1 *	9,00 $\pm$ 0,9 *
<b>1</b>	8,23 $\pm$ 1,1	10,12 $\pm$ 1,4 *	10,04 $\pm$ 1,5 *	9,71 $\pm$ 1,4 *	9,54 $\pm$ 0,9 *	9,13 $\pm$ 1,4 *	9,01 $\pm$ 2,0 *
<b>2</b>	8,23 $\pm$ 1,1	10,53 $\pm$ 1,5 *	9,79 $\pm$ 1,0 *	9,75 $\pm$ 1,7 *	9,72 $\pm$ 2,4 *	9,63 $\pm$ 1,9 *	9,38 $\pm$ 1,3 *
<b>3</b>	8,23 $\pm$ 1,1	9,35 $\pm$ 0,6 *	9,30 $\pm$ 1,3 *	9,22 $\pm$ 1,5 *	9,14 $\pm$ 2,1 *	9,10 $\pm$ 1,1 *	8,97 $\pm$ 1,2 *
<b>4</b>	8,23 $\pm$ 1,1	9,96 $\pm$ 0,7 *	9,71 $\pm$ 1,6 *	9,63 $\pm$ 1,6 *	9,38 $\pm$ 2,2 *	9,22 $\pm$ 1,9 *	9,05 $\pm$ 0,8 *
<b>5</b>	8,23 $\pm$ 1,1	9,88 $\pm$ 1,7 *	9,47 $\pm$ 0,5 *	9,35 $\pm$ 1,4 *	9,30 $\pm$ 1,8 *	9,24 $\pm$ 1,5 *	9,14 $\pm$ 1,3 *
<b>6</b>	8,23 $\pm$ 1,1	9,96 $\pm$ 0,9 *	9,71 $\pm$ 1,1 *	9,63 $\pm$ 2,0 *	9,55 $\pm$ 1,7 *	9,38 $\pm$ 2,0 *	9,30 $\pm$ 0,6 *
<b>7</b>	8,23 $\pm$ 1,1	9,75 $\pm$ 0,7 *	9,70 $\pm$ 1,0 *	9,62 $\pm$ 2,2 *	9,60 $\pm$ 2,2 *	9,40 $\pm$ 1,3 *	9,38 $\pm$ 0,4 *
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	9,54 $\pm$ 1,9	21,07 $\pm$ 1,5 *	20,10 $\pm$ 1,6 *	18,05 $\pm$ 1,6 *	17,15 $\pm$ 1,3 *	17,10 $\pm$ 2,0 *	16,50 $\pm$ 2,4 *
<b>1</b>	9,54 $\pm$ 1,9	21,37 $\pm$ 1,4 *	20,89 $\pm$ 2,5 *	18,60 $\pm$ 1,1 *	17,55 $\pm$ 1,1 *	17,17 $\pm$ 2,2 *	16,79 $\pm$ 1,5 *
<b>2</b>	9,54 $\pm$ 1,9	20,42 $\pm$ 1,6 *	20,13 $\pm$ 1,5 *	19,08 $\pm$ 1,0 *	18,79 $\pm$ 1,0 *	18,60 $\pm$ 2,0 *	18,51 $\pm$ 1,7 *
<b>3</b>	9,54 $\pm$ 1,9	19,94 $\pm$ 1,5 *	19,65 $\pm$ 1,6 *	19,10 $\pm$ 1,3 *	18,98 $\pm$ 1,3 *	17,46 $\pm$ 1,5 *	14,69 $\pm$ 1,6 *
<b>4</b>	9,54 $\pm$ 1,9	20,32 $\pm$ 2,1 *	19,65 $\pm$ 1,3 *	19,27 $\pm$ 1,7 *	18,41 $\pm$ 1,7 *	18,22 $\pm$ 1,7 *	15,08 $\pm$ 1,3 *
<b>5</b>	9,54 $\pm$ 1,9	17,50 $\pm$ 2,5 *	16,96 $\pm$ 2,4 *	16,31 $\pm$ 1,5 *	15,92 $\pm$ 1,5 *	15,14 $\pm$ 1,2 *	14,97 $\pm$ 1,2 *
<b>6</b>	9,54 $\pm$ 1,9	16,60 $\pm$ 1,6 *	16,26 $\pm$ 1,6 *	15,98 $\pm$ 2,2 *	15,88 $\pm$ 2,2 *	15,09 $\pm$ 0,5 *	14,91 $\pm$ 1,4 *
<b>7</b>	9,54 $\pm$ 1,9	19,94 $\pm$ 0,7 *	17,55 $\pm$ 1,4 *	16,84 $\pm$ 1,8 *	15,77 $\pm$ 1,8 *	15,02 $\pm$ 1,4 *	14,74 $\pm$ 1,5 *
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	15,10 $\pm$ 1,5	22,95 $\pm$ 1,5 *	22,49 $\pm$ 1,4 *	21,29 $\pm$ 2,3 *	20,68 $\pm$ 1,6 *	20,38 $\pm$ 2,8 *	19,47 $\pm$ 2,1 *
<b>1</b>	15,10 $\pm$ 1,5	23,10 $\pm$ 2,0 *	21,74 $\pm$ 1,6 *	21,14 $\pm$ 1,4 *	20,53 $\pm$ 0,8 *	20,38 $\pm$ 2,4 *	19,78 $\pm$ 2,2 *
<b>2</b>	15,10 $\pm$ 1,5	32,01 $\pm$ 1,8 *	22,80 $\pm$ 1,5 *	22,19 $\pm$ 1,8 *	20,98 $\pm$ 2,1 *	20,68 $\pm$ 1,8 *	20,38 $\pm$ 2,3 *
<b>3</b>	15,10 $\pm$ 1,5	28,23 $\pm$ 1,6 *	25,06 $\pm$ 1,3 *	24,01 $\pm$ 1,7 *	20,98 $\pm$ 2,0 *	20,38 $\pm$ 1,6 *	19,48 $\pm$ 1,5 *
<b>4</b>	15,10 $\pm$ 1,5	31,71 $\pm$ 2,6 *	24,76 $\pm$ 1,6 *	23,86 $\pm$ 1,6 *	21,89 $\pm$ 2,2 *	20,99 $\pm$ 1,3 *	19,33 $\pm$ 2,2 *
<b>5</b>	15,10 $\pm$ 1,5	38,95 $\pm$ 1,5 *	36,84 $\pm$ 2,5 *	32,61 $\pm$ 2,4 *	30,20 $\pm$ 1,8 *	21,14 $\pm$ 2,4 *	20,08 $\pm$ 2,7 *
<b>6</b>	15,10 $\pm$ 1,5	35,18 $\pm$ 1,9 *	31,56 $\pm$ 1,4 *	30,80 $\pm$ 2,1 *	28,23 $\pm$ 1,7 *	23,25 $\pm$ 2,3 *	19,78 $\pm$ 2,6 *
<b>7</b>	15,10 $\pm$ 1,5	26,42 $\pm$ 1,0 *	23,55 $\pm$ 1,7 *	23,25 $\pm$ 2,5 *	23,10 $\pm$ 2,2 *	20,83 $\pm$ 1,3 *	19,63 $\pm$ 1,3 *

Концентрација тоталног глутатиона је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

Резултати нивоа тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона у НСТ-116 ћелијама након третмана дериватима хидантоина у свих шест испитиваних концентрација у сва три



временска интервала су приказани у табелама. У **Табели 11** је приказан ниво тоталног глутатиона, **Табели 12** је приказан ниво редукованог глутатиона и у **Табели 13** је приказан ниво оксидованог глутатиона.

Ниво тоталног и редукованог глутатиона је статистички значајно повећан у односу на ниво у нетретираним контролним ћелија у сва три временска третмана, док је најснажнији ефекат у смањењу оксидованог глутатиона новосинтетисаним дериватима хидантоина, испољен након 72 сата третмана у концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ .

**Табела 12.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво редукованог глутатиона у НСТ-116 ћелијама.

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24 h</b>							
<b>0</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,96 $\pm$ 1,5 *	9,77 $\pm$ 1,6 *	9,49 $\pm$ 2,0 *	9,07 $\pm$ 1,3 *	8,91 $\pm$ 2,1 *	8,71 $\pm$ 2,4 *
<b>1</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,79 $\pm$ 1,4 *	9,72 $\pm$ 2,5 *	9,40 $\pm$ 0,7 *	9,24 $\pm$ 1,1 *	8,83 $\pm$ 2,2 *	8,72 $\pm$ 1,5 *
<b>2</b>	7,88 $\pm$ 1,3	10,19 $\pm$ 1,6 *	9,46 $\pm$ 1,5 *	9,43 $\pm$ 1,2 *	9,41 $\pm$ 1,0 *	9,32 $\pm$ 2,0 *	9,09 $\pm$ 1,7 *
<b>3</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,01 $\pm$ 1,5 *	8,97 $\pm$ 1,6 *	8,90 $\pm$ 2,3 *	8,83 $\pm$ 1,3 *	8,80 $\pm$ 1,5 *	8,69 $\pm$ 1,6 *
<b>4</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,62 $\pm$ 2,1 *	9,41 $\pm$ 1,3 *	9,34 $\pm$ 1,5 *	9,10 $\pm$ 1,7 *	8,95 $\pm$ 1,7 *	8,79 $\pm$ 1,3 *
<b>5</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,55 $\pm$ 2,5 *	9,16 $\pm$ 2,4 *	9,05 $\pm$ 2,3 *	9,01 $\pm$ 1,5 *	8,96 $\pm$ 1,2 *	8,87 $\pm$ 1,2 *
<b>6</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,62 $\pm$ 1,6 *	9,38 $\pm$ 1,6 *	9,32 $\pm$ 2,1 *	9,25 $\pm$ 2,2 *	9,09 $\pm$ 0,5 *	9,02 $\pm$ 1,4 *
<b>7</b>	7,88 $\pm$ 1,3	9,41 $\pm$ 0,7 *	9,37 $\pm$ 1,4 *	9,30 $\pm$ 2,2 *	9,29 $\pm$ 1,8 *	9,10 $\pm$ 1,4 *	9,09 $\pm$ 1,5 *
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	8,84 $\pm$ 1,9	20,42 $\pm$ 1,9 *	19,47 $\pm$ 1,1 *	17,43 $\pm$ 1,5 *	16,55 $\pm$ 1,1 *	16,52 $\pm$ 2,4 *	15,67 $\pm$ 2,0 *
<b>1</b>	8,84 $\pm$ 1,9	20,73 $\pm$ 1,6 *	20,26 $\pm$ 2,1 *	17,98 $\pm$ 1,1 *	16,95 $\pm$ 1,4 *	16,59 $\pm$ 2,5 *	16,22 $\pm$ 1,2 *
<b>2</b>	8,84 $\pm$ 1,9	19,73 $\pm$ 1,1 *	19,48 $\pm$ 1,3 *	18,45 $\pm$ 1,9 *	18,17 $\pm$ 1,5 *	18,00 $\pm$ 2,0 *	17,92 $\pm$ 1,4 *
<b>3</b>	8,84 $\pm$ 1,9	19,30 $\pm$ 1,2 *	19,02 $\pm$ 1,5 *	18,48 $\pm$ 1,4 *	18,38 $\pm$ 1,3 *	16,88 $\pm$ 1,7 *	14,19 $\pm$ 1,7 *
<b>4</b>	8,84 $\pm$ 1,9	19,68 $\pm$ 2,0 *	19,05 $\pm$ 1,8 *	18,69 $\pm$ 1,7 *	17,85 $\pm$ 1,1 *	17,69 $\pm$ 1,9 *	14,57 $\pm$ 1,6 *
<b>5</b>	8,84 $\pm$ 1,9	16,82 $\pm$ 2,2 *	16,31 $\pm$ 2,1 *	15,69 $\pm$ 1,5 *	15,33 $\pm$ 1,7 *	14,57 $\pm$ 1,2 *	14,42 $\pm$ 1,3 *
<b>6</b>	8,84 $\pm$ 1,9	15,93 $\pm$ 1,8 *	15,62 $\pm$ 1,7 *	15,37 $\pm$ 2,1 *	15,29 $\pm$ 2,2 *	14,51 $\pm$ 1,3 *	14,36 $\pm$ 1,2 *
<b>7</b>	8,84 $\pm$ 1,9	19,27 $\pm$ 0,9 *	16,90 $\pm$ 1,3 *	16,21 $\pm$ 1,8 *	15,17 $\pm$ 1,8 *	14,44 $\pm$ 1,1 *	14,18 $\pm$ 1,5 *
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	13,60 $\pm$ 1,2	21,62 $\pm$ 1,4 *	21,27 $\pm$ 2,6 *	20,15 $\pm$ 2,1 *	19,58 $\pm$ 1,8 *	19,40 $\pm$ 2,0 *	18,54 $\pm$ 2,1 *
<b>1</b>	13,60 $\pm$ 1,2	21,70 $\pm$ 2,4 *	20,36 $\pm$ 2,5 *	19,83 $\pm$ 0,7 *	19,24 $\pm$ 1,4 *	19,13 $\pm$ 2,4 *	18,73 $\pm$ 1,8 *
<b>2</b>	13,60 $\pm$ 1,2	30,58 $\pm$ 1,6 *	21,41 $\pm$ 1,5 *	20,84 $\pm$ 1,2 *	19,68 $\pm$ 2,3 *	19,40 $\pm$ 1,5 *	19,17 $\pm$ 2,5 *
<b>3</b>	13,60 $\pm$ 1,2	26,84 $\pm$ 1,5 *	23,75 $\pm$ 1,6 *	22,73 $\pm$ 2,3 *	19,76 $\pm$ 1,5 *	19,23 $\pm$ 1,8 *	18,38 $\pm$ 1,4 *
<b>4</b>	13,60 $\pm$ 1,2	30,36 $\pm$ 2,1 *	23,56 $\pm$ 1,3 *	22,78 $\pm$ 1,5 *	20,92 $\pm$ 1,7 *	20,09 $\pm$ 2,2 *	18,48 $\pm$ 2,3 *
<b>5</b>	13,60 $\pm$ 1,2	37,58 $\pm$ 2,5 *	35,50 $\pm$ 2,4 *	31,32 $\pm$ 2,3 *	28,97 $\pm$ 1,4 *	19,95 $\pm$ 2,5 *	18,93 $\pm$ 2,2 *
<b>6</b>	13,60 $\pm$ 1,2	33,76 $\pm$ 2,6 *	30,18 $\pm$ 1,6 *	29,46 $\pm$ 2,1 *	26,96 $\pm$ 2,2 *	22,04 $\pm$ 2,4 *	18,60 $\pm$ 2,4 *
<b>7</b>	13,60 $\pm$ 1,2	25,08 $\pm$ 1,7 *	22,26 $\pm$ 1,4 *	21,98 $\pm$ 2,2 *	21,87 $\pm$ 2,3 *	19,64 $\pm$ 1,2 *	18,49 $\pm$ 1,2 *

Концентрација редукованог глутатиона је изражена у  $\text{nmol/ml}$ . Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

**Табела 13.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво оксидованог глутатиона у НСТ-116 ћелијама

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24 h</b>							
<b>0</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,03
<b>1</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,01
<b>2</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,03
<b>3</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,06
<b>4</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,08
<b>5</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,07
<b>6</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,08	0,30 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,09	0,28 $\pm$ 0,07
<b>7</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,08	0,30 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,05
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,05
<b>1</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,02
<b>2</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,05
<b>3</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,08
<b>4</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,03
<b>5</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,05
<b>6</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,08
<b>7</b>	0,70 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,04
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,33 $\pm$ 0,3 *	1,22 $\pm$ 0,8 *	1,14 $\pm$ 0,8 *	1,10 $\pm$ 0,3 *	0,98 $\pm$ 0,5 *	0,93 $\pm$ 0,5 *
<b>1</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,40 $\pm$ 0,6 *	1,38 $\pm$ 0,6 *	1,31 $\pm$ 0,6 *	1,29 $\pm$ 0,2 *	1,25 $\pm$ 0,9 *	1,05 $\pm$ 0,1 *
<b>2</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,43 $\pm$ 0,2 *	1,39 $\pm$ 0,9 *	1,35 $\pm$ 0,4 *	1,30 $\pm$ 0,4 *	1,28 $\pm$ 0,7 *	1,21 $\pm$ 0,3 *
<b>3</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,39 $\pm$ 0,3 *	1,31 $\pm$ 0,8 *	1,28 $\pm$ 0,7 *	1,22 $\pm$ 0,1 *	1,15 $\pm$ 0,3 *	1,10 $\pm$ 0,6 *
<b>4</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,35 $\pm$ 0,9 *	1,20 $\pm$ 0,7 *	1,08 $\pm$ 0,9 *	0,97 $\pm$ 0,5 *	0,90 $\pm$ 0,7 *	0,85 $\pm$ 0,2 *
<b>5</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,37 $\pm$ 0,4 *	1,34 $\pm$ 0,2 *	1,29 $\pm$ 0,1 *	1,23 $\pm$ 0,2 *	1,19 $\pm$ 0,1 *	1,15 $\pm$ 0,8 *
<b>6</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,42 $\pm$ 0,5 *	1,38 $\pm$ 0,3 *	1,34 $\pm$ 0,5 *	1,27 $\pm$ 0,4 *	1,21 $\pm$ 0,4 *	1,18 $\pm$ 0,4 *
<b>7</b>	1,50 $\pm$ 0,20	1,34 $\pm$ 0,4 *	1,29 $\pm$ 0,6 *	1,27 $\pm$ 0,4 *	1,23 $\pm$ 0,8 *	1,19 $\pm$ 0,6 *	1,14 $\pm$ 0,5 *

Концентрација оксидованог глутатиона је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

#### 4.6.2. Ниво тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама третираним дериватима хидантоина

Резултати нивоа тоталног, редукованог и оксидованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама након третмана дериватима хидантоина у свих шест испитиваних концентрација у сва три временска интервала су приказани у следеће три табеле. У **Табели 14** је приказан ниво тоталног глутатиона, **Табели 15** је приказан ниво редукованог глутатиона и у **Табели 16** је приказан ниво оксидованог глутатиона.

Ниво тоталног и редукованог глутатиона је значајно повећан у третираним MDA-MB-231 ћелијама у односу на ниво у нетретираним контролним ћелијама у сва три временска теримна и уочена је јасна временска зависност. До најзначајнијег смањењења нивоа оксидованог глутатиона је дошло након 72 сата третмана. Дериват **4** је испољио најјачи ефекат, како у повећању тоталног и редукованог нивоа глутатиона, тако и у смањењу оксидованог глутатиона у сва три периода трајања третмана.

**Табела 14.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво тоталног глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24 h</b>							
<b>0</b>	10,15 $\pm$ 1,1	15,05 $\pm$ 1,2 *	14,90 $\pm$ 1,7 *	14,39 $\pm$ 1,5 *	14,08 $\pm$ 1,7 *	13,88 $\pm$ 2,6 *	13,50 $\pm$ 1,8 *
<b>1</b>	10,15 $\pm$ 1,1	16,10 $\pm$ 2,4 *	15,70 $\pm$ 1,5 *	15,04 $\pm$ 1,6 *	14,50 $\pm$ 2,2 *	14,10 $\pm$ 2,2 *	13,95 $\pm$ 1,2 *
<b>2</b>	10,15 $\pm$ 1,1	20,09 $\pm$ 1,7 *	19,50 $\pm$ 1,2 *	18,90 $\pm$ 2,1 *	18,58 $\pm$ 2,3 *	18,15 $\pm$ 1,6 *	16,10 $\pm$ 2,5 *
<b>3</b>	10,15 $\pm$ 1,1	22,20 $\pm$ 1,9 *	21,49 $\pm$ 1,3 *	20,01 $\pm$ 1,5 *	17,90 $\pm$ 1,8 *	15,85 $\pm$ 1,8 *	12,55 $\pm$ 1,9 *
<b>4</b>	10,15 $\pm$ 1,1	25,70 $\pm$ 2,1 *	23,06 $\pm$ 1,5 *	20,60 $\pm$ 1,4 *	18,90 $\pm$ 2,4 *	16,19 $\pm$ 1,5 *	13,05 $\pm$ 2,5 *
<b>5</b>	10,15 $\pm$ 1,1	19,90 $\pm$ 1,3 *	19,18 $\pm$ 2,1 *	18,56 $\pm$ 2,2 *	17,40 $\pm$ 1,6 *	16,14 $\pm$ 2,2 *	15,98 $\pm$ 2,1 *
<b>6</b>	10,15 $\pm$ 1,1	25,60 $\pm$ 1,2 *	23,60 $\pm$ 1,6 *	20,95 $\pm$ 2,3 *	18,30 $\pm$ 1,9 *	17,75 $\pm$ 2,1 *	16,89 $\pm$ 2,3 *
<b>7</b>	10,15 $\pm$ 1,1	23,49 $\pm$ 1,5 *	22,35 $\pm$ 1,9 *	20,15 $\pm$ 2,1 *	19,55 $\pm$ 2,0 *	17,43 $\pm$ 1,5 *	16,39 $\pm$ 1,7 *
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	11,38 $\pm$ 1,3	17,50 $\pm$ 1,5 *	16,90 $\pm$ 1,4 *	15,95 $\pm$ 2,3 *	15,63 $\pm$ 1,8 *	15,38 $\pm$ 2,8 *	14,43 $\pm$ 2,1 *
<b>1</b>	11,38 $\pm$ 1,3	17,41 $\pm$ 2,0 *	16,39 $\pm$ 1,6 *	15,93 $\pm$ 1,4 *	15,48 $\pm$ 0,9 *	15,36 $\pm$ 2,4 *	14,45 $\pm$ 2,2 *
<b>2</b>	11,38 $\pm$ 1,3	24,13 $\pm$ 1,8 *	20,18 $\pm$ 1,5 *	19,73 $\pm$ 1,8 *	18,82 $\pm$ 2,4 *	17,59 $\pm$ 1,8 *	16,90 $\pm$ 2,3 *
<b>3</b>	11,38 $\pm$ 1,3	21,28 $\pm$ 1,6 *	18,89 $\pm$ 1,3 *	18,09 $\pm$ 1,7 *	15,82 $\pm$ 2,1 *	15,36 $\pm$ 1,6 *	14,08 $\pm$ 1,5 *
<b>4</b>	11,38 $\pm$ 1,3	29,97 $\pm$ 2,6 *	22,73 $\pm$ 1,6 *	17,98 $\pm$ 1,6 *	16,90 $\pm$ 2,2 *	16,50 $\pm$ 1,3 *	15,02 $\pm$ 2,2 *
<b>5</b>	11,38 $\pm$ 1,3	29,36 $\pm$ 1,5 *	27,77 $\pm$ 2,5 *	24,58 $\pm$ 2,4 *	22,76 $\pm$ 1,8 *	19,70 $\pm$ 2,4 *	17,14 $\pm$ 2,7 *
<b>6</b>	11,38 $\pm$ 1,3	26,52 $\pm$ 1,9 *	23,78 $\pm$ 1,4 *	23,22 $\pm$ 2,1 *	21,28 $\pm$ 1,7 *	19,41 $\pm$ 2,3 *	17,79 $\pm$ 2,6 *
<b>7</b>	11,38 $\pm$ 1,3	19,92 $\pm$ 1,0 *	17,75 $\pm$ 1,7 *	17,53 $\pm$ 2,5 *	17,41 $\pm$ 2,2 *	16,82 $\pm$ 1,3 *	16,70 $\pm$ 1,3 *
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	18,50 $\pm$ 1,9	23,05 $\pm$ 1,4 *	22,95 $\pm$ 1,8 *	21,79 $\pm$ 2,1 *	20,60 $\pm$ 1,6 *	19,30 $\pm$ 2,2 *	19,07 $\pm$ 2,0 *
<b>1</b>	18,50 $\pm$ 1,9	23,50 $\pm$ 2,2 *	22,40 $\pm$ 1,2 *	21,54 $\pm$ 1,6 *	20,90 $\pm$ 0,8 *	20,05 $\pm$ 2,1 *	19,80 $\pm$ 2,3 *
<b>2</b>	18,50 $\pm$ 1,9	30,90 $\pm$ 1,8 *	28,20 $\pm$ 1,3 *	27,90 $\pm$ 1,3 *	25,89 $\pm$ 2,1 *	24,60 $\pm$ 1,5 *	20,38 $\pm$ 2,1 *
<b>3</b>	18,50 $\pm$ 1,9	26,41 $\pm$ 1,1 *	24,90 $\pm$ 1,3 *	24,10 $\pm$ 1,4 *	22,80 $\pm$ 1,9 *	20,35 $\pm$ 1,4 *	19,41 $\pm$ 1,9 *
<b>4</b>	18,50 $\pm$ 1,9	35,85 $\pm$ 2,4 *	30,80 $\pm$ 1,1 *	25,80 $\pm$ 1,5 *	22,90 $\pm$ 2,0 *	20,79 $\pm$ 1,7 *	19,30 $\pm$ 1,7 *
<b>5</b>	18,50 $\pm$ 1,9	35,45 $\pm$ 1,3 *	33,80 $\pm$ 2,4 *	32,64 $\pm$ 2,1 *	30,90 $\pm$ 1,5 *	27,40 $\pm$ 2,0 *	25,80 $\pm$ 1,9 *
<b>6</b>	18,50 $\pm$ 1,9	33,20 $\pm$ 1,4 *	32,60 $\pm$ 1,3 *	31,75 $\pm$ 2,0 *	29,20 $\pm$ 1,4 *	25,50 $\pm$ 2,5 *	23,70 $\pm$ 2,1 *
<b>7</b>	18,50 $\pm$ 1,9	28,24 $\pm$ 1,7 *	25,45 $\pm$ 1,5 *	23,20 $\pm$ 2,2 *	22,90 $\pm$ 2,1 *	21,30 $\pm$ 1,8 *	20,15 $\pm$ 1,8 *

Концентрација редукованог глутатиона је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

**Табела 15.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво редукованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама

Бр./Конц.	0 $\mu$ M	0,01 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>24 h</b>							
<b>0</b>	9,60 $\pm$ 0,9	14,53 $\pm$ 1,4 *	14,40 $\pm$ 2,6 *	13,91 $\pm$ 2,1 *	13,61 $\pm$ 1,3 *	13,43 $\pm$ 2,1 *	13,09 $\pm$ 2,1 *
<b>1</b>	9,60 $\pm$ 0,9	15,60 $\pm$ 2,4 *	15,21 $\pm$ 2,5 *	14,57 $\pm$ 0,7 *	14,04 $\pm$ 1,1 *	13,66 $\pm$ 2,2 *	13,53 $\pm$ 1,8 *
<b>2</b>	9,60 $\pm$ 0,9	19,56 $\pm$ 1,6 *	19,00 $\pm$ 1,5 *	18,41 $\pm$ 1,2 *	18,12 $\pm$ 2,3 *	17,72 $\pm$ 1,5 *	15,69 $\pm$ 2,5 *
<b>3</b>	9,60 $\pm$ 0,9	21,68 $\pm$ 1,5 *	20,99 $\pm$ 1,6 *	19,54 $\pm$ 2,3 *	17,47 $\pm$ 1,5 *	15,45 $\pm$ 1,8 *	12,17 $\pm$ 1,4 *
<b>4</b>	9,60 $\pm$ 0,9	25,17 $\pm$ 2,1 *	22,55 $\pm$ 1,3 *	20,10 $\pm$ 1,5 *	18,42 $\pm$ 1,7 *	15,74 $\pm$ 2,2 *	12,65 $\pm$ 2,3 *
<b>5</b>	9,60 $\pm$ 0,9	19,37 $\pm$ 2,5 *	18,66 $\pm$ 2,4 *	18,06 $\pm$ 2,3 *	16,91 $\pm$ 1,5 *	15,67 $\pm$ 2,5 *	15,53 $\pm$ 2,2 *
<b>6</b>	9,60 $\pm$ 0,9	25,08 $\pm$ 2,6 *	23,09 $\pm$ 1,6 *	20,47 $\pm$ 2,1 *	17,84 $\pm$ 2,2 *	17,30 $\pm$ 2,4 *	16,47 $\pm$ 2,4 *
<b>7</b>	9,60 $\pm$ 0,9	22,96 $\pm$ 1,7 *	21,85 $\pm$ 1,4 *	19,66 $\pm$ 2,2 *	19,08 $\pm$ 2,3 *	16,97 $\pm$ 1,2 *	15,96 $\pm$ 1,5 *
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	10,52 $\pm$ 1,5	16,70 $\pm$ 1,3*	16,12 $\pm$ 2,3*	15,30 $\pm$ 2,4 *	15,03 $\pm$ 1,8 *	14,81 $\pm$ 2,0 *	13,88 $\pm$ 2,3 *
<b>1</b>	10,52 $\pm$ 1,5	16,63 $\pm$ 2,2 *	15,67 $\pm$ 2,4 *	15,25 $\pm$ 0,9 *	14,85 $\pm$ 1,7 *	14,76 $\pm$ 2,0 *	13,87 $\pm$ 1,5 *
<b>2</b>	10,52 $\pm$ 1,5	23,30 $\pm$ 1,1 *	19,42 $\pm$ 1,9 *	19,04 $\pm$ 1,1 *	18,15 $\pm$ 2,0 *	16,94 $\pm$ 1,9 *	16,31 $\pm$ 2,1 *
<b>3</b>	10,52 $\pm$ 1,5	20,51 $\pm$ 1,4 *	18,14 $\pm$ 1,5 *	17,39 $\pm$ 2,0 *	15,17 $\pm$ 1,6 *	14,77 $\pm$ 1,5 *	13,56 $\pm$ 1,7 *
<b>4</b>	10,52 $\pm$ 1,5	29,13 $\pm$ 2,1 *	21,95 $\pm$ 1,8 *	17,31 $\pm$ 1,3 *	16,27 $\pm$ 1,8 *	15,91 $\pm$ 2,0 *	14,49 $\pm$ 2,0 *
<b>5</b>	10,52 $\pm$ 1,5	28,58 $\pm$ 2,2 *	27,00 $\pm$ 2,0 *	23,89 $\pm$ 2,2 *	22,16 $\pm$ 1,4 *	19,13 $\pm$ 1,6 *	16,59 $\pm$ 2,1 *
<b>6</b>	10,52 $\pm$ 1,5	25,70 $\pm$ 2,1 *	22,27 $\pm$ 1,3 *	22,47 $\pm$ 1,9 *	20,59 $\pm$ 2,1 *	18,75 $\pm$ 1,7 *	17,18 $\pm$ 1,9 *
<b>7</b>	10,52 $\pm$ 1,5	19,15 $\pm$ 1,8 *	17,02 $\pm$ 1,9 *	16,82 $\pm$ 1,5 *	16,71 $\pm$ 2,0 *	16,14 $\pm$ 1,8 *	16,10 $\pm$ 1,6 *
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	16,55 $\pm$ 2,1	21,22 $\pm$ 1,5*	21,16 $\pm$ 1,9*	20,14 $\pm$ 2,3 *	19,02 $\pm$ 1,3 *	17,85 $\pm$ 1,8 *	17,72 $\pm$ 2,0 *
<b>1</b>	16,55 $\pm$ 2,1	21,71 $\pm$ 2,1 *	20,66 $\pm$ 2,1 *	19,85 $\pm$ 1,7 *	19,35 $\pm$ 1,4 *	18,56 $\pm$ 2,2 *	18,41 $\pm$ 1,5 *
<b>2</b>	16,55 $\pm$ 2,1	28,99 $\pm$ 1,2 *	26,33 $\pm$ 1,8 *	26,12 $\pm$ 1,2 *	24,22 $\pm$ 2,3 *	23,02 $\pm$ 1,5 *	18,94 $\pm$ 2,0 *
<b>3</b>	16,55 $\pm$ 2,1	24,53 $\pm$ 1,4 *	23,18 $\pm$ 1,4 *	22,43 $\pm$ 2,1 *	21,28 $\pm$ 1,6 *	18,94 $\pm$ 1,9 *	18,16 $\pm$ 1,9 *
<b>4</b>	16,55 $\pm$ 2,1	33,87 $\pm$ 2,3 *	28,91 $\pm$ 1,9 *	24,22 $\pm$ 1,9 *	21,41 $\pm$ 1,8 *	19,42 $\pm$ 2,0 *	18,04 $\pm$ 2,1 *
<b>5</b>	16,55 $\pm$ 2,1	33,55 $\pm$ 2,2 *	31,93 $\pm$ 2,0 *	30,83 $\pm$ 2,1 *	29,15 $\pm$ 1,6 *	25,71 $\pm$ 2,2 *	24,27 $\pm$ 2,0 *
<b>6</b>	16,55 $\pm$ 2,1	31,35 $\pm$ 2,3 *	30,83 $\pm$ 1,5 *	30,12 $\pm$ 2,3 *	27,63 $\pm$ 2,3 *	24,01 $\pm$ 2,1 *	22,28 $\pm$ 2,1 *
<b>7</b>	16,55 $\pm$ 2,1	26,44 $\pm$ 1,1 *	23,81 $\pm$ 1,7 *	21,64 $\pm$ 1,6 *	21,45 $\pm$ 1,9 *	19,93 $\pm$ 1,9 *	18,85 $\pm$ 1,8 *

Концентрација редукованог глутатиона је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављенау триликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

**Табела 16.** Ефекат испитиваних деривата хидантоина на ниво оксидованог глутатиона у MDA-MB-231 ћелијама

Бр./Конц.	0 $\mu\text{M}$	0,01 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>24 h</b>							
<b>0</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,03
<b>1</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,01
<b>2</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,03
<b>3</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,10	0,40 $\pm$ 0,09	0,38 $\pm$ 0,06
<b>4</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,09	0,48 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,09
<b>5</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,09
<b>6</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,07	0,51 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,07
<b>7</b>	0,55 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,05
<b>48 h</b>							
<b>0</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,05
<b>1</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,04
<b>2</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,08
<b>3</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,05
<b>4</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,04
<b>5</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,78 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,07	0,55 $\pm$ 0,07
<b>6</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,04	0,69 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,04
<b>7</b>	0,86 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,03
<b>72 h</b>							
<b>0</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,83 $\pm$ 0,4 *	1,79 $\pm$ 0,3 *	1,65 $\pm$ 0,4 *	1,58 $\pm$ 0,6 *	1,45 $\pm$ 0,5 *	1,35 $\pm$ 0,7 *
<b>1</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,79 $\pm$ 0,8 *	1,74 $\pm$ 0,6 *	1,69 $\pm$ 0,5 *	1,55 $\pm$ 0,4 *	1,49 $\pm$ 0,6 *	1,39 $\pm$ 0,4 *
<b>2</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,91 $\pm$ 0,2 *	1,87 $\pm$ 0,9 *	1,78 $\pm$ 0,4 *	1,67 $\pm$ 0,6 *	1,58 $\pm$ 0,9 *	1,44 $\pm$ 0,4 *
<b>3</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,88 $\pm$ 0,3 *	1,72 $\pm$ 0,8 *	1,67 $\pm$ 0,6 *	1,52 $\pm$ 0,3 *	1,41 $\pm$ 0,8 *	1,25 $\pm$ 0,5 *
<b>4</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,98 $\pm$ 0,9 *	1,89 $\pm$ 0,7 *	1,58 $\pm$ 0,5 *	1,49 $\pm$ 0,5 *	1,37 $\pm$ 0,6 *	1,26 $\pm$ 0,6 *
<b>5</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,90 $\pm$ 0,4 *	1,87 $\pm$ 0,2 *	1,81 $\pm$ 0,3 *	1,75 $\pm$ 0,3 *	1,69 $\pm$ 0,4 *	1,53 $\pm$ 0,4 *
<b>6</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,85 $\pm$ 0,5 *	1,77 $\pm$ 0,3 *	1,63 $\pm$ 0,9 *	1,57 $\pm$ 0,3 *	1,49 $\pm$ 0,3 *	1,42 $\pm$ 0,4 *
<b>7</b>	1,95 $\pm$ 0,50	1,80 $\pm$ 0,1 *	1,64 $\pm$ 0,5 *	1,56 $\pm$ 0,3 *	1,45 $\pm$ 0,6 *	1,37 $\pm$ 0,4 *	1,30 $\pm$ 0,6 *

Концентрација оксидованог глутатиона је изражена у pmol/ml. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату.

(\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

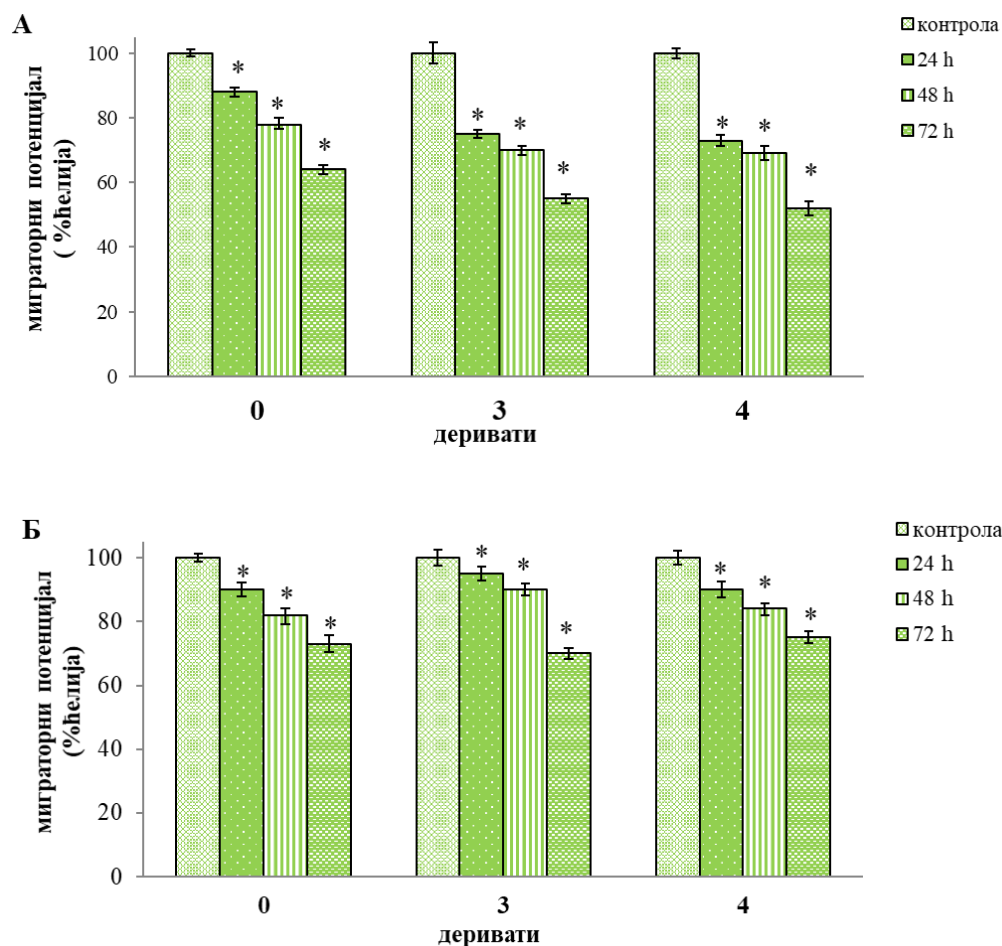
#### 4.7. Утицај испитиваних деривата хидантоина на миграторни потенцијал туморских ћелија

Туморске метастазе укључују низ процеса који резултују дисеминацијом ћелија тумора са иницијалних локација тумора на анатомски удаљена места органа и њихово прилагођавање новим микроокружењима. Миграторни потенцијал туморских ћелија пресудан је аспект у прогресији тумора и један је од параметара за праћење ефикасности различитих антитуморских стратегија.

##### 4.7.1. Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних одабраним дериватима хидантоина

За испитивање ефекта одабраних деривата хидантоина на миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија коришћен је trans-well миграторни есеј. Резултати приказани на **Графику 9** показују значајно смањење индекса миграције НСТ-116 ћелија третираних одабраним дериватима **0**, **3** и **4** у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у поређењу са миграторним потенцијалом

нетретираних контролних ћелија у сва три испитивана временска интервала. НСТ-116 ћелије третиране свим одабраним дериватима **0**, **3** и **4** након продуженог третмана у трајању 72 сата су показале најмањи миграторни потенцијал у поређењу са смањењем миграторног потенцијала након 24 и 48 сати третмана.



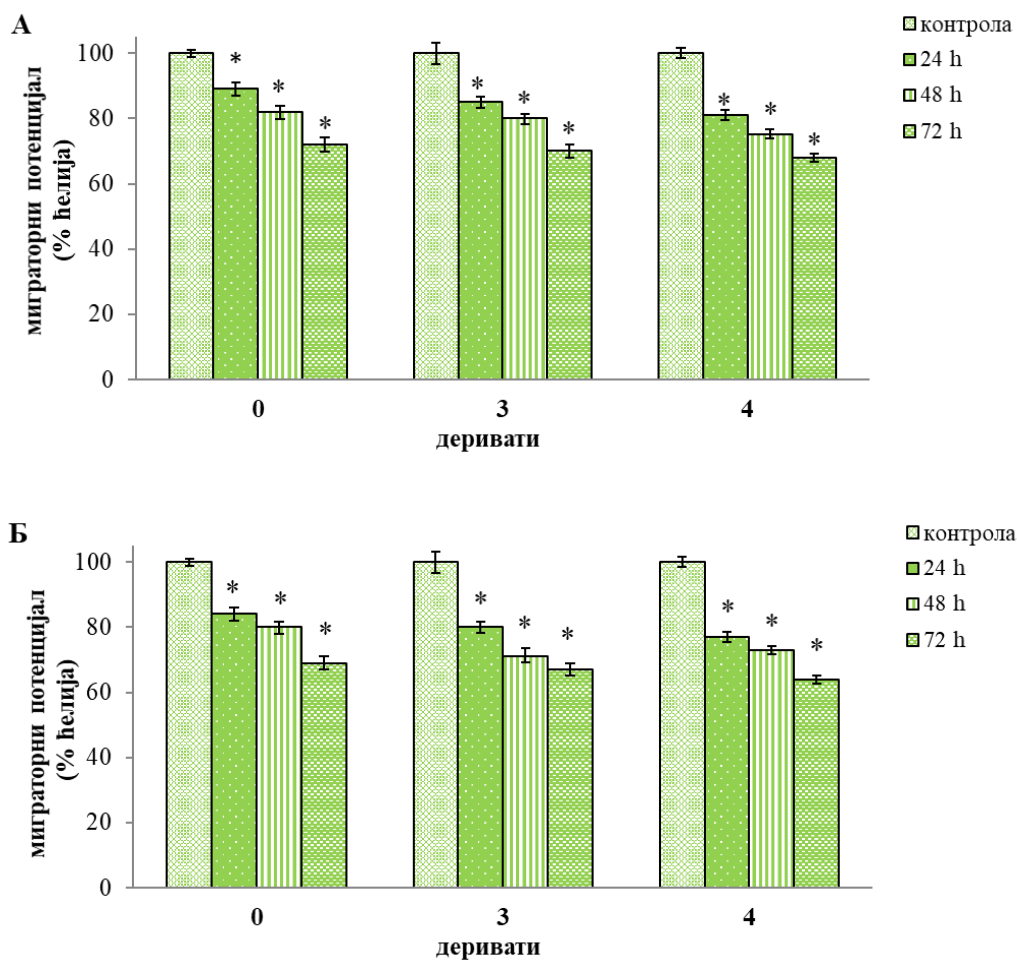
**График 9.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на миграторни капацитет НСТ-116 ћелија.

Ћелије су третиране одабраним дериватима у концентрацији (А) 1  $\mu\text{M}$  и (Б) 10  $\mu\text{M}$  током 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (100%))

#### 4.7.2. Миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија третираних одабраним дериватима хидантоина

Ефекат одабраних деривата хидантоина на миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија одређиван је transwell миграторним тестом и резултати су представљени на **Графику 10**. Значајно смањење миграције показале су MDA-MB-231 ћелије које су третиране одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у поређењу са миграторним потенцијалом нетретираних ћелија у сва три испитивана временска интервала. Дуготрајни третман са одабраним дериватима хидантоина доводи до најизраженијег

смањења индекса миграције у односу на краткотрајни третман, што сугерише на присуство временске зависности у њиховом деловању.



**График 10.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на миграторни капацитет MDA-MB-231 ћелија.

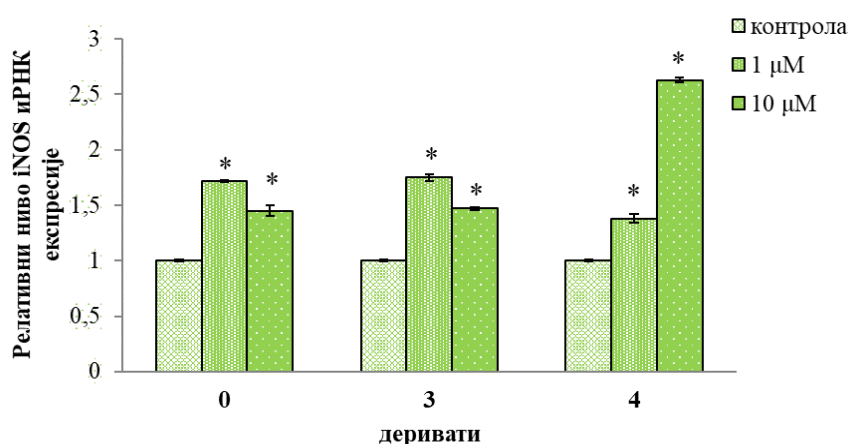
Ћелије су третиране одабраним дериватима у концентрацији (А) 1  $\mu\text{M}$  и (Б) 10  $\mu\text{M}$  током 24, 48 и 72 сата. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (100%))

#### 4.8. Утицај одабраних деривата хидантоина на експресију гена од значаја за туморогенезу

У овој студији је одређен ниво експресије гена од значаја за регулацију миграције/инвазије ћелија тумора. Ниво експресије испитиваних гена одређен је qRT-PCR методом. Експресија гена је одређена након продуженог третмана у трајању 72 сата када је забележено најизраженије смањење миграторног потенцијала обе испитиване туморске ћелијске линије.

#### 4.8.1. Експресија *iNOS* гена у НСТ-116 ћелијама третираним одабраним дериватима хидантоина

**График 11** приказује промене експресионог профила иРНК за *iNOS* НСТ-116 ћелија након 72 сата третмана одабраним деривата хидантоина **0**, **3** и **4**. Добијени резултати указују да продужени третман са сва три деривата у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  узрокује статистички значајно повећање експресије иРНК за *iNOS* у поређењу са експресијом у нетретираним ћелијама.



**График 11.** Релативни ниво експресије иРНК за *iNOS* након третмана НСТ-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 72 сата

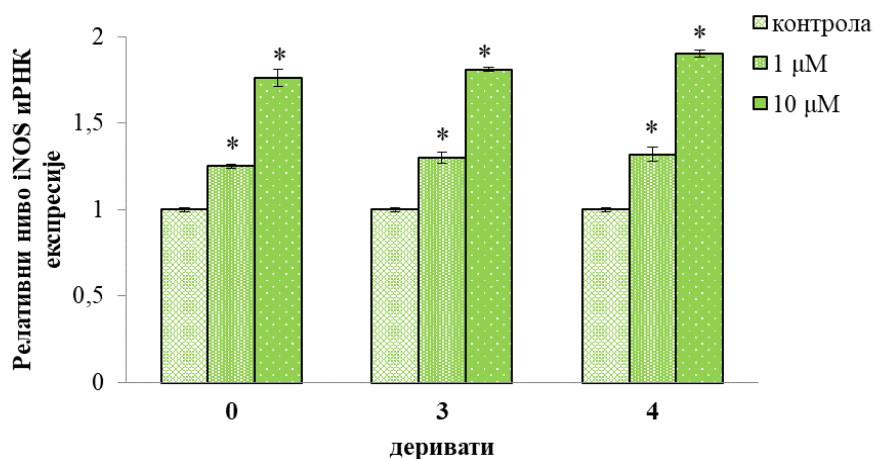
Резултати су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама код којих је ниво експресије дефинисан као 1).

#### 4.8.2. Експресија *iNOS* гена у MDA-MB-231 ћелијама третираним одабраним дериватима хидантоина

На **Графику 12**, су приказане промене у експресији иРНК за *iNOS* MDA-MB-231 ћелија индуковане третманом одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4**.

Добијени резултати показују да продужени третман у трајању од 72 сата MDA-MB-231 ћелија у присуству сва три деривата у обе испитиване концентрације доводи до статистички значајног повећања експресије иРНК за *iNOS* у односу на експресију у нетретираним контролним ћелијама.



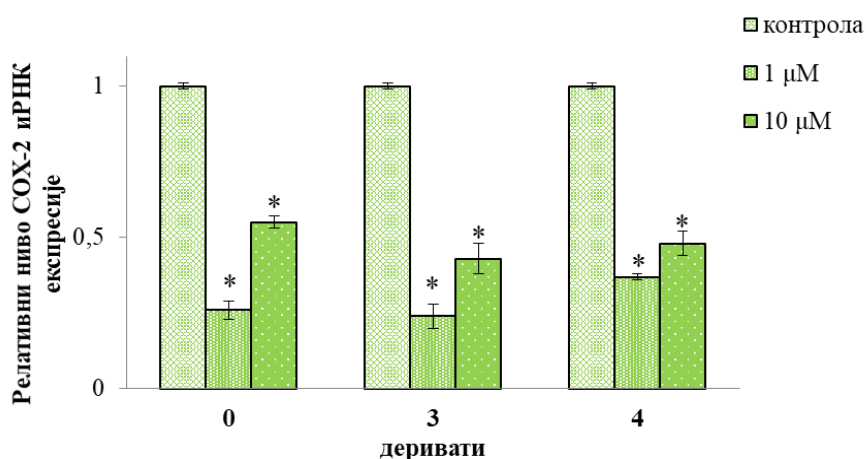


**График 12.** Релативни ниво експресије иРНК за *iNOS* након третмана MDA-MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1 µM и 10 µM током 72 сата

Резултати су изражени као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама код којих је ниво експресије дефинисан као 1)

#### 4.8.3. Експресија *COX-2* гена у НСТ-116 ћелијама третираним одабраним дериватима хидантоина

На **Графику 13** су приказани ефекти одабраних деривата хидантоина **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1 µM и 10 µM на експресију иРНК за *COX-2* у НСТ-116 ћелијама након продуженог третмана у трајању 72 сата. Приказани резултати показују да третман НСТ-116 ћелијама одабраним дериватима у обе испитиване концентрације доводи до статистички значајног смањења експресије иРНК за *COX-2* у поређењу са експресијом у контролним нетретираним ћелијама.

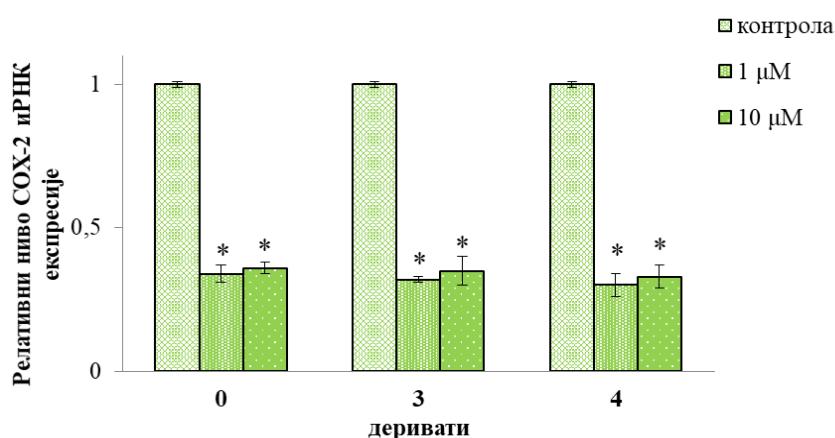


**График 13.** Релативни ниво експресије иРНК за *COX-2* након третмана НСТ-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1 µM и 10 µM током 72 сата

Резултати су изражени као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама код којих је ниво експресије дефинисан као 1)

#### 4.8.4. Експресија *COX-2* гена у *MDA-MB-231* ћелијама третираним одабраним дериватима хидантоина

Утицај одабраних деривата хидантоина **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  на промену експресије иРНК за *COX-2* у *MDA-MB-231* ћелијама након продуженог третмана од 72 сата приказан је на **Графику 14**. Приказани резултати указују да третман овим дериватима у обе испитиване концентрације узрокује статистички значајно смањење у експресији иРНК за *COX-2* у односу на експресију у контролним нетретираним ћелијама.

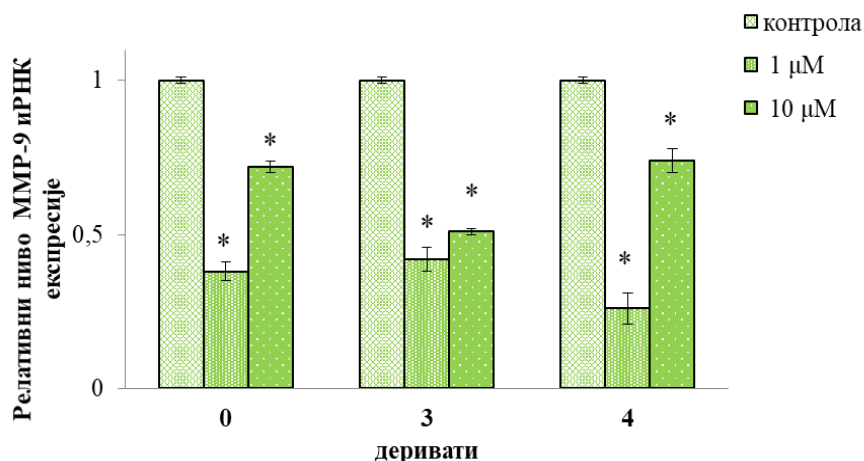


**График 14.** Релативни ниво експресије иРНК за *COX-2* након третмана *MDA-MB-231* ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 72 сата

Резултати су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама код којих је ниво експресије дефинисан као 1)

#### 4.8.5. Експресија *MMP-9* гена у *HCT-116* ћелијама третираним одабраним дериватима хидантоина

Ефекат третмана *HCT-116* ћелија одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** на ниво експресије иРНК за *MMP-9* је приказан на **Графику 15**. Приказани резултати указују да продужени третман од 72 сата одабраним дериватима хидантоина у обе испитиване концентрације индукује статистички значајно смањење експресије иРНК за *MMP-9* у односу на експресију у ћелијама које нису третиране.

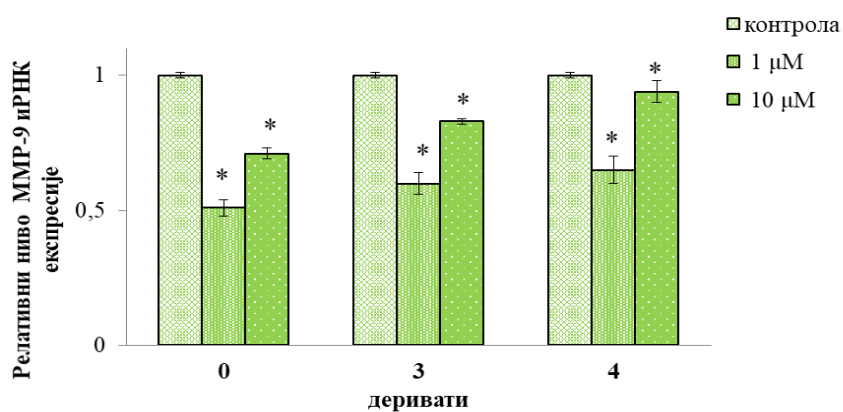


**График 15.** Релативни ниво експресије иРНК за *MMP-9* након третмана HCT-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1 μM и 10 μM током 72 сата

Резултати су изражени као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама)

#### 4.8.6. Експресија *MMP-9* гена у MDA-MB-231 ћелијама третираним одабраним дериватима хидантоина

Ефекат третмана MDA-MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** на ниво експресије иРНК за *MMP-9* је приказан на **Графику 16**. Резултати указују да продужени третман у присуству деривата **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1 μM и 10 μM доводи до статистички значајног смањења експресије иРНК за *MMP-9* у односу на експресију детектовану у контролним нетретираним ћелијама.



**График 16.** Релативни ниво експресије иРНК за *MMP-9* након третмана MDA-MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина у концентрацији 1 μM и 10 μM током 72 сата

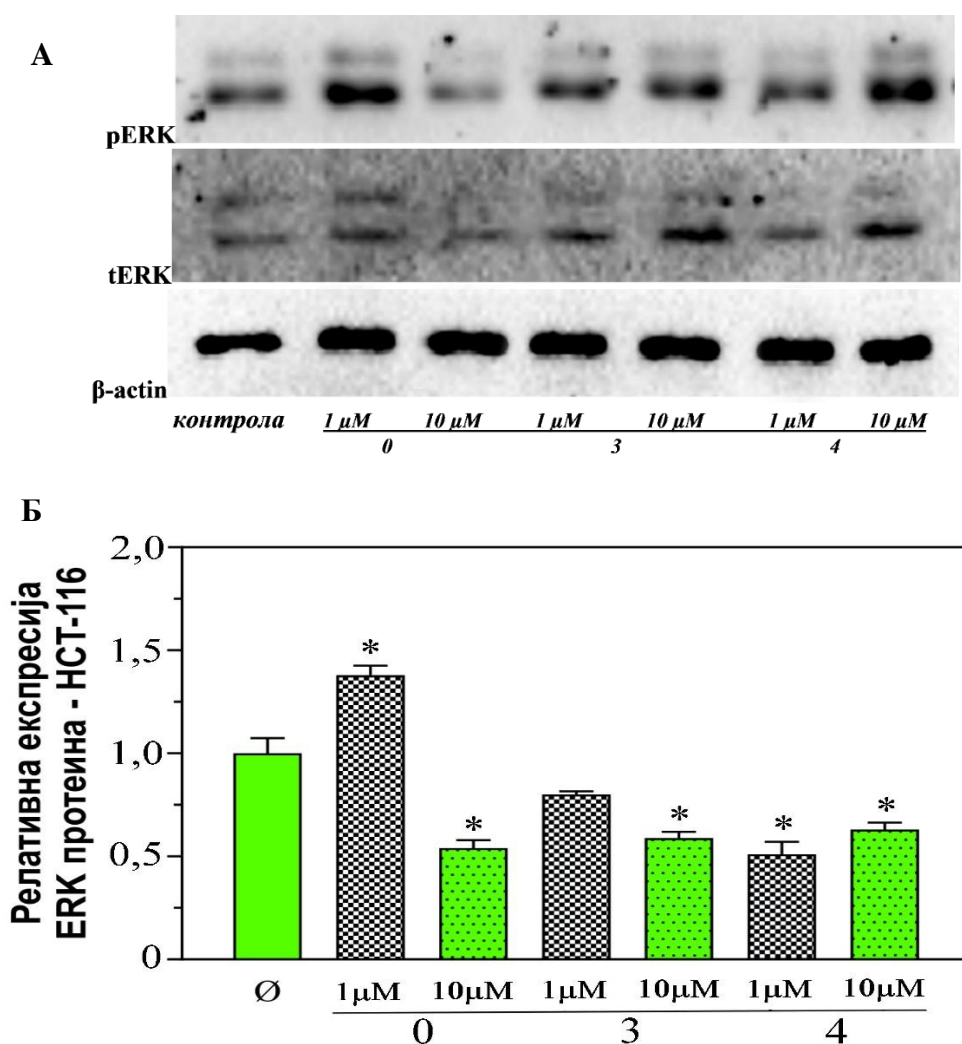
Резултати су изражени као средња вредност ± стандардна грешка три независна експеримента постављена у трипликату. (\* $p < 0,05$  третиране ћелије у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама код којих је ниво експресије дефинисан као 1)

#### 4.9. Улога и активност сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање ћелија

МАРК каскаде су централни сигнални елементи који регулишу широк спектар ћелијских процеса укључујући пролиферацију и диференцијацију ћелија, апоптозу и реакције на стрес. Један од сигналних молекула чију смо активност пратили у НСТ-116 ћелијама тумора дебелог црева, и MDA-MB-231 ћелијама тумора дојке, је екстрацелуларним сигнаlima регулисана киназа 1/2 (ERK1/2) која припада МАРК суперфамилији и игра улогу у сигналним каскадама и преноси ванћелијске сигнале до унутарћелијских циљева. ERK1/2 је још један сигнални молекул чију смо активност пратили након третмана обе ћелијске линије одабраним дериватима (**0**, **3** и **4**) у две испитиване концентрације током 72 сата. Хиперактивација ERK-а игра велику улогу у развоју и прогресији тумора. Такође, пратили смо активност још једног сигналног молекула суперфамилије МАРК, JNK киназа, у MDA-MB-231 ћелијама након третмана одабраним дериватима (**0**, **3** и **4**) у две испитиване концентрације током 72 сата.

##### 4.9.1. Активност сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање НСТ-116 ћелија

НСТ-116 ћелије третиране су одабраним дериватима **0**, **3** и **4** у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 72 сата. Након третмана ћелијски лизати су коришћени за детекцију фосфо и тотал форми ERK1/2 сигналних молекула. Са **Слике 20 А** уочава се да је третман НСТ-116 ћелија дериватом **0** у нижој испитиваној концентрацији од 1  $\mu\text{M}$  довео до повећања експресије фосфо форме ERK1/2 у односу на ниво експресије у нетретираним контролним ћелијама, док је концентрација од 10  $\mu\text{M}$  довела до смањења релативне експресије фосфо форме ERK1/2 у односу на ниво експресије у контролним ћелијама. Такође, и третмани дериватима хидатоина **3** и **4** су довели до смањења релативне експресије ERK1/2 сигналног молекула, што је приказано на **Слици 20 А и Б**.

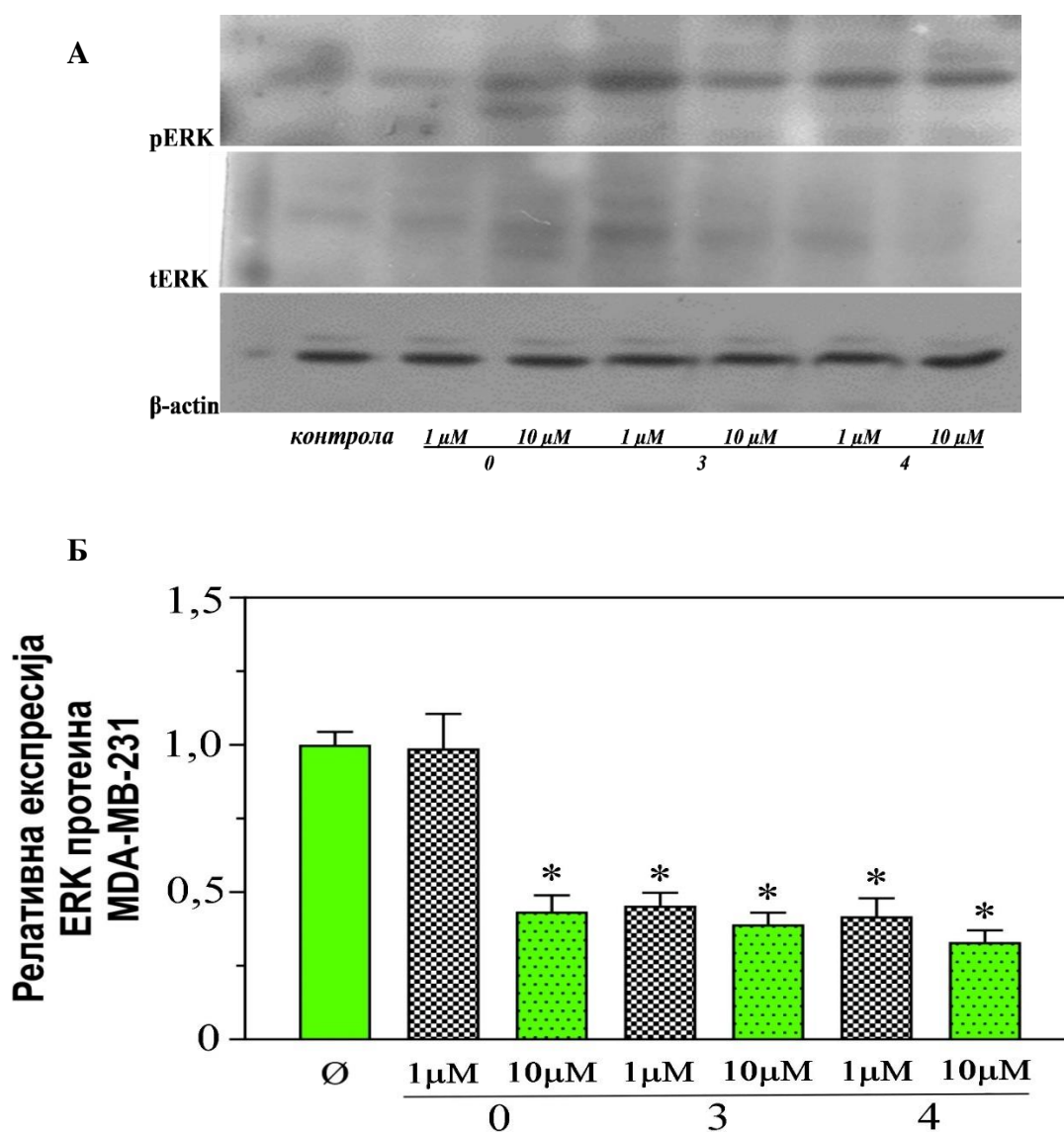


**Слика 20.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активациони статус ERK1/2 сигналног пута у HCT-116 ћелијама

HCT-116 ћелије су третиране одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**) у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата након тога применом имуноблот методе је одређен активациони статус сигналних путева (А), након чега су рачунати нивои експресије фосфо и тотал форми ERK1/2 киназа (Б) (приказани резултати су из једног од два експеримента са сличним резултатима).

#### 4.9.2. Активност сигналних молекула укључених у смрт и преживљавање MDA MB-231 ћелија

MDA-MB-231 ћелије су гајене у присуству одабраних деривата хидантоина **0**, **3** и **4** у концентрацији 1  $\mu$ M и 10  $\mu$ M током 72 сата. На **Слици 21 А** и **Б** се уочава да третман MDA-MB-231 ћелија одабраним дериватима хидантоина значајно инхибира експресију фосфо форми ERK1/2 у поређењу са експресијом код нетретираних ћелија у свим испитиваним концентрацијама деривата хидантоина, осим деривата **0** у концентрацији 1  $\mu$ M.

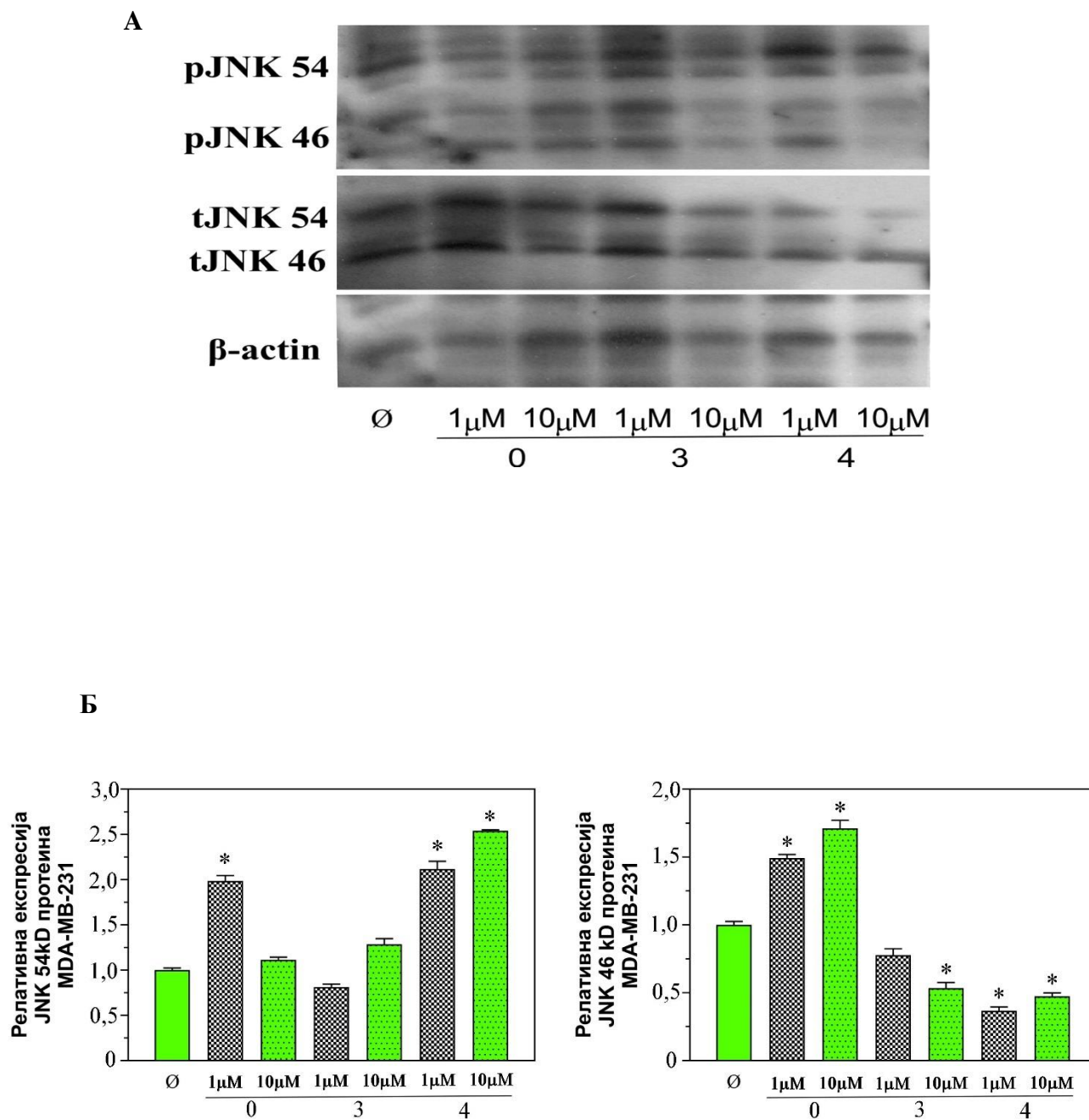


**Слика 21.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активациони статус ERK1/2 сигналног пута у MDA-MB-231 ћелијама

MDA-MB-231 ћелије су третиране одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**) у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 72 сата након тога применом имуноблот методе је одређен активациони статус сигналних путева (А), након чега су рачунати нивои експресије фосфо и тотал форми ERK1/2 киназа (Б) (приказани резултати су из једног од два експеримента са сличним резултатима).

Нивои експресије фосфо и тотал форми JNK сигналних молекула у MDA-MB-231 ћелијама су приказани на **Слици 22**. Релативна експресија изоформе JNK протеина од 54 kDa показује значајно повећање активности ове киназе као одговор на третман дериватом **0** у концентрацији од 1  $\mu\text{M}$ , као и дериватом **4** у обе примењене концентрације. Однос фосфо и тотал изоформе JNK протеина од 46 kDa указује на значајно повећање активности ове киназе као одговор на обе примењене дозе деривата **0**. Такође, показано је да приликом излагања MDA-MB-231 ћелија дериватима **3** и **4** долази до инактивације испитиване киназе, што је приказано смањењем релативне експресије JNK киназе.





**Слика 22.** Ефекат одабраних деривата хидантоина на активациони статус JNK сигналног пута у MDA-MB-231 ћелијама

MDA-MB-231 ћелије су третиране одабраним дериватима хидантоина (**0, 3 и 4**) у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током 72 сата након тога применом имуноблот методе је одређен активациони статус сигналних путева (A), након чега су рачунате релативне експресије обе изоформе JNK киназе (B) (приказани резултати су из једног од два експеримента са сличним резултатима).

## **5. Дискусија**



Деривати хидантоина привлаче велику пажњу истраживача јер представљају једињења која се све више користе у различитим областима медицине. Многобројна истраживања биолошких активности различитих деривата хидантоина показала су да ова једињења поседују антиконвулзивна, антиаритмична, антиинфламаторна и антихипертензивна својства (Vamesq и сар., 2000; Thenmozhiyal и сар, 2004; Herrera и сар., 2015; Kumar и сар., 2017). Такође, показано је да деривати хидантоина испољавају антимикуробна, хербицидна и фунгицидна својства, поред за ово истраживање значајне антитуморске активности (Basarra и сар., 2009; Jintao и сар., 2013; Marinova и сар., 2016). Све већа пажња се усмерава на синтезу и проучавање деривата хидантоина, управо због многобројних биолошких активности ових једињења. Бројне студије су показале значајну корелацију између група које садрже основну структуру хидантоинског прстена и њихових биолошких ефеката, док је низ истраживања фокусиран на синтезу нових модификованих деривата са циљем проширења њихових постојећих биолошких активности (Jansen и сар., 2003). Циљ модификације постојећих деривата хидантоина је дизајнирање нових једињења са снажнијим или промењеним фармаколошким профилима од оних који су постојећи облици испољавали до тада. Цитотоксичност уобичајених неспецифичних хемиотерапеутика ограничила је њихову примену у хемиотерапији, а пошто већина хуманих малигних тумора развија резистенцију на лекове, успостављање терапије са мање токсичним и селективнијим антитуморским једињењима је од суштинске важности. Сходно свим наведеним чињеницама још увек постоји потреба да се пронађу мање токсични лекови који поседују широк спектар антитуморске активности. У складу са најновијим молекуларно имунолошким методама и дубљим разумевањем ћелијског метаболизма, данас се развијају напреднији хемиотерапеутски агенси (Eckhardt, 2002).

Један од најпогоднијих модел система за проучавање механизма настанка и развоја тумора је тумор дебелог црева. Највећи број облика тумора дебелог црева настаје у каскадном процесу нагомилавања мутационих промена, при чему се иницијални бенигни аденом трансформише у малигни инвазивни карцином (Henderson и Fagotto, 2002). Велика генска хетерогеност тј. генска нестабилност метастатске прогресије тумора дебелог црева, даје серију хистолошки различитих слика које одговарају стадијумима развоја тумора (Fodde и сар., 2001). Тумор дебелог црева трећи је најчешћи тип тумора на западној хемисфери и један је од водећих узрока смрти изазван туморима уопште (Siegel и сар., 2014). До 20% пацијената има метастатску дисеминацију, најчешће у јетри. Хирушки захват је ефикасан третман само за мањи број пацијената, док зрачење и придружена хемиотерапија остају доминантна терапија за туморе дебелог црева са метастазама на лимфним чворовима (Haraldsdottir и сар., 2014).

Тумор дојке представља још један прикладан модел систем за проучавање метаболизма и прогресије тумора. Тумор дојке је најчешћи тип тумора и други водећи узрок смрти повезан са тумором код жена широм света, са више од пола милиона случајева сваке године (Murad и сар., 2016). Упркос широкој употреби мултимодалне терапије, ниво смртности остаје висок, што наглашава потребу за коришћењем нових терапијских средстава са значајним антитуморским ефектом и израженијом селективношћу у односу на здрава ткива. Хемиотерапија се развила открићем цитостатика чиме је отворен нови пут за синтезу лекова са антитуморском активношћу. Неке студије су показале да различита хетероциклична једињења која садрже атом азота, слично као и сам хидантоин и његови деривати, показују значајно антипролиферативно деловање на ћелије хуманих тумора дојке (Gomha и сар., 2016; Gomha и сар., 2018; Тао и сар., 2018).

Значајна антитуморска активност деривата хидантоина чини ова једињења важним експерименталним агенсима у развоју савремене терапије против тумора. Циљ овог истраживања био је проценити и дефинисати биолошке ефекте серије деривата **3-(4-супституисаних бензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоина** на индекс пролиферације, ниво апоптозе, каспазну активност, прогресију ћелијског циклуса, оксидативно /антиоксидативну равнотежу, производњу нитрита и потенцијал миграције/инвазије хумане ћелијске линије тумора дебелог црева, НСТ-116 и тумора дојке, MDA-MB-231. Такође, током студије је вршено поређење ефеката ових једињења на различите параметре метаболизма ћелија тумора дебелог црева и тумора дојке.

Варијације хидантоинског прстена могу се наћи као саставни део структуре многих лекова који се користе у хемиотерапији. Један од најистакнутијих антитуморских механизма деривата хидантоина је њихов значајан антипролиферативни потенцијал који је тестиран на различитим врстама туморских ћелија (Cavazzoni и сар., 2008, Zuliani и сар., 2009, Sekulić Dјaković и сар., 2015). Различите студије су указале на значајану цитотоксичну активност деривата хидантоина према различитим типовима туморских ћелија: деривати спирохидантоина показују антипролиферативни ефекат према ћелијама карцинома грлића материце и ћелијама тумора дојке и индукују инхибицију раста леукемијских ћелија (Rajić и сар., 2006; Kavitha и сар., 2009). Студија коју су спровели Kumar и сарадници показала је значајан инхибиторни ефекат одређених деривата диазаспиро-бициклохидантоина, са супституисаним циклоалкилним, фенилним и бензхидрилним групама, на пролиферацију ћелија тумора дојке (MCF-7 ћелијска линија), ћелија хепатоцелуларног карцинома (HepG-2 ћелијска линија), ћелија карцинома грлића материце (HeLa ћелијска линија) и ћелија тумора дебелог црева (HT-29 ћелијска линија) (Kumar и сар., 2009). Ароматичне јединице на положају C5 показале су се као значајне за интеракције са биолошким структурама и студије су показале да 5-бензилиден-хидантоини, као биоизостери 4-анилинокиназолина, инхибирају експресију рецептора епидермалног фактора раста (енгл. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) и већ су одобрени за лечење тумора плућа (Carmi и сар., 2006; Cavazzoni и сар., 2008). Смањење пролиферативног потенцијала ћелија тумора је један од најважнијих циљева у развоју антитуморских терапија.

У овој студији, испитивани су ефекти седам новосинтетисаних деривата хидантоина, са променљивим бензил-супституентима на N-3 атому хидантоинског прстена, према ћелијској линији хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116 и тумора дојке, MDA-MB-231. Како је у претходној серији хидантоина једињење N-3 дериват са бензилним супституентом показало најјачи антипролиферативни ефекат (Trišović и сар., 2011), тако је један од циљева ове студије била процена антитуморске активности деривата са најинтензивнијим ефектима из претходне студије (**3-бензил-5,5-дифенилхидантоин**) означеног као дериват **0** и серије **3-(4-супституисаних бензил)-5-изопропил-5-фенилхидантоин** деривата. Сви испитивани деривати су показали интензивнију антипролиферативну активност у односу на једињење **0** након продуженог третмана (72 сата).

Биокомпатибилност одражава степен селективности антипролиферативног деловања хемиотерапеутика између здравих ћелија и ћелија тумора. За тест биокомпатибилности у студији су коришћени нормални хумани фибробласти плућа MRC-5, и добијени подаци указују на задовољавајућу селективност свих тестираних деривата у инхибицији пролиферације између туморских ћелија у односу на здраве. С обзиром на задовољавајућу биокомпатибилност, отвара се могућност употребе ових деривата у потенцијалном лечењу тумора дебелог црева и тумора дојке.

Сви испитивани деривати хидантоина показали су снажну антипролиферативну активност у дозној и временској зависности према НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама до концентрације од 10  $\mu\text{M}$ . Једињења **3** и **4** показују најјачи антипролиферативни ефекат према ћелијама тумора дебелог црева у односу на ефекат свих осталих деривата из ове серије испитиваних деривата. Дериват **4** са хлоро-супституентом показао је најјачи антипролиферативни ефекат према ћелијској линији тумора дојке који је у складу са литературним подацима (Sekulić Djaković и сар., 2015). Најјачи антипролиферативни ефекат у овој студији показали су деривати хидантоина у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  што је био главни разлог да се ове две концентрације користе за даље тестирање њихових ефекта на остале испитиване параметре.

Међусобним поређењем добијених ефеката испитиваних деривата хидантоина према обе туморске ћелијске линије, запажа се већа осетљивост НСТ-116 ћелија, са нижим  $\text{IC}_{50}$  вредностима након третмана испитиваним дериватима, у односу на ефекте испољене према MDA-MB-231 ћелијама. Оваква разлика у осетљивости ћелија може се приписати пореклу и карактеристикама туморских ћелија. Наиме, док су НСТ-116 ћелије пореклом из примарног тумора, MDA-MB-231 ћелије потичу из ћелија из плеуралног излива метастатског тумора дојке, дакле од ћелија које су већ стекле способност за метастазирање.

Апоптоза игра кључну улогу у развоју организма, хомеостази ткива, имунском одговору и етиологији бројних болести, укључујући туморе (Matsuura и сар., 2016, Fuchs и Steller, 2015). Туморске ћелије избегавају апоптозу, прекомерно се умножавају и преживљавају у хипоксичним условима, стичући резистентност на терапеутска средства (Liang и сар., 2018). Међу различитим механизмима који доприносе избегавању апоптозе у туморским ћелијама, њихове специфичне метаболичке адаптације и сигнализације се појављују као кључни фактори. Ћелијски метаболити и различити сигнални молекули могу регулисати активацију про- и анти-апоптотских протеина укључујући каспазе, фамилију протеаза специфичних за аспарагинску киселину, који су главни ефектори апоптозе (Matsuura и сар., 2016). Каспазе се нормално синтетишу као неактивни прекурсори, али се активирају различитим сигнаlima активације апоптозе (Logue и Martin, 2008). Каспазе и њихови регулатори постају потенцијално атрактивни таргети за развој нових антитуморских терапија. Агенси који индукују апоптозу су често ефикасни антитуморски лекови, јер је апоптоза заштитни механизам ткива против развоја тумора који елиминише генетски оштећене ћелије из ткива пре него што подлегну клонској експанзији (Hassan и сар., 2014).

Апоптоза и некроза су познати механизми смрти туморских ћелија. Апоптоза је, без обзира на врсту индукције (унутрашњи или спољашњи пут), најчешће повезана са специфичном каспазном каскадом (Galluzzi и сар., 2008), док је некроза акутни, искључиво патолошки тип ћелијске смрти и најчешће је индукована јаком ткивном траумом. ROS имају могућност да индукују ћелијску смрт апоптозом и некрозом (Higuchi и сар., 1998). ROS се дефинишу као доминантни фактори оксидативног стреса и сматрају се важним гласницима у ћелијском метаболизму (Li и сар., 2016).

Утврђено је да спирохидантоински деривати показују про-апоптотску активност на ћелијским линијама тумора јajника и дојке (Gomez-Monterrey и сар., 2005). На основу добијених резултата у тесту пролиферације, тестиран је про-апоптотски потенцијал једињења **0**, **3** и **4** у НСТ-116 ћелијама. Третман са сва три једињења је довео до повећања броја ћелија у апоптози зависно од дозе и времена излагања. Главни тип ћелијске смрти у НСТ-116 ћелијама, индукован одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**), била је апоптоза, док је детектован статистички незнатан проценат некротичних ћелија. С обзиром да је циљ

сваке терапије индукција апоптозе туморских ћелија (Shin и сар., 2009), добијени резултати указују на то да би ови деривати хидантоина могли бити од великог интереса за даља истраживања у развоју ефикаснијих хемиотерапија.

Претходне студије су показале да NO може индуковати ћелијску смрт утицајем на апоптотске митохондријалне протеине (Messmer и сар., 1996; Snyder и сар., 2009). Подаци добијени у нашој студији указују да би значајни про-апоптотски нивои у MDA-MB-231 ћелијама могли бити посредовани повећаном продукцијом NO изазваном испитиваним дериватима који би могли да активирају компоненте унутрашњих про-апоптотских путева. Осим тога, прекомерна концентрација NO може да промовише формирање екстремно агресивног пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), који је један од кључних молекула оштећења у различитим патолошким стањима, укључујући туморе (Pacher и сар., 2007). Пероксинитрити могу да индукују активацију p38 и c-Jun N-терминалне киназе (енгл. *c-Jun N-terminal kinases*, JNK) која иницира унутрашњи пут апоптозе (Go и сар., 1999; Schieke и сар., 1999; Shacka и сар., 2006). Наши резултати указују да су ови испитивани деривати хидантоина, јаки индуктори апоптозе, како код ћелија тумора дебелог црева, HCT-116 ћелије, тако и код тумора дојке, MDA-MB-231 ћелија, могу одговорати потенцијалу ових молекула да генерише NO.

Поређењем испитиваних ћелијских линија, запажа се већа осетљивост сада MDA-MB-231 ћелија на испитиване третмане, про-апоптотске активности третмана у односу на HCT-116 ћелије. У третману са дериватом **4** показан је најизраженији про-апоптотски ефекат након 72 сата у односу на друга два третмана и на третман HCT-116 ћелијама.

Још један од показатеља њихове про-апоптотске активности је путем активације каспаза, што се показује појачавањем флуоресцентног сигнала у односу на контролне вредности у нетретираним ћелијама, при чему је повећана осетљивост HCT-116 ћелија у односу на MDA-MB-231 ћелије, у третману одабраним деривата **0**, **3** и **4** током 24 и 72 сата концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$ . Најјачи ефекат је остварио дериват **0** након продуженог третмана 72 сата у концентрацији 10  $\mu\text{M}$  код HCT-116 ћелија, док је код осталих деривата најјачи ефекат показао дериват **3** након продуженог третмана у трајању 72 сата при концентрацији 1  $\mu\text{M}$ . Код MDA-MB-231 ћелија најјачи ефекат показао је дериват **4** након продуженог третмана у трајању 72 сата при концентрацији 10  $\mu\text{M}$ .

Неколико студија је показало да NSAID могу да модулирају прогресију ћелијског циклуса (Schneider и сар., 2001; Gao и Williams., 2012). Експресија и активност циклина и циклин зависних киназа модулирана је од стране више NSAID и то COX независним начином деловања (Gurpinar и сар., 2013). Имајући у виду да деривати хидантоина остварују неке ефекте сличне ефектима NSAID, овакав начин модулације ћелијског циклуса ћелија третираних испитиваним дериватима хидантоина је могућ.

Наши резултати указују да третман одабраним дериватима **0**, **3** и **4** у сва три временска интервала код обе ћелијске линије, HCT-116 и MDA-MB-231, у обе коришћене концентрације доводи до пролонгираног трајања S фазе ћелијског циклуса. Док је у експерименту са HCT-116 ћелијама најјачи ефекат остварен након третмана у трајању 72 сата дериватом **4** у концентрацији 10  $\mu\text{M}$ , у експерименту са MDA-MB-231 ћелијама након третмана 72 сата у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  најјачи ефекат је испољио дериват **3**, док је у концентрацији 10  $\mu\text{M}$  најјачи ефекат остварио дериват **4** а све у поређењу са контролним ћелијама. Ове разлике могу указати на разлике у механизму деловања испитиваних деривата према различитим типовима тумора.

JNK сигнални молекули припадају суперфамилји MAPK и укључени су у регулацију пролиферације и диференцијације ћелија, као и у апоптотску смрт ћелија. Студије су показале да се иста сигнална каскада активира и у случају пролиферације и у случају апоптозе, па исход активације овог сигналног пута зависи од врсте иницијалног стимуланса и типа ћелије у којима се активација одвија (Lin и Dibling, 2002; Liu и Lin, 2005). JNK сигнални пут игра кључну улогу у реализацији како спољашњег, тако и унутрашњег пута апоптозе. Киназе овог сигналног пута активирају про-апоптотске гене трансактивацијом специфичних транскрипционих фактора или директном модулацијом активности митохондријалних про-и/или анти-апоптотских протеина кроз дефинисане процесе фосфорилације (Bogoyevitch и сар., 2010). До данас је детектован већи број варијанти насталих алтернативним сплајсовањем, али кодираним помоћу једног од три гена JNK1, JNK2 и JNK3 (Davis, 2000; Johnson и Nakamura, 2007). JNK представљају последњу секвенцу у трокиназном моделу трансфера сигнала, извршавајући функцију терминалних киназа (Dhanasekaran и сар., 2007).

У овој докторској дисертацији је испитиван ефекат синтетисаних деривата хидантоина на JNK сигнални пут у MDA-MB-231 ћелијама. Однос фосфорилисане форме и укупног садржаја JNK изоформе од 54 kDa, показао је да третман испитиваним једињењима значајно повећава активност овог киназног пута у MDA-MB-231 након третмана дериватима **0** и **4** у обе испитиване концентрације, док је у овим ћелијама након третмана дериватом **3** у концентрацији 1  $\mu\text{M}$  детектована смањена активност која није била статистички значајна. Однос фосфорилисане форме и укупног садржаја JNK изоформе од 46 kDa, указао је на значајно повећање активности ове киназе у одговору MDA-MB-231 ћелија на третман дериватом **0** при обе испитиване концентрације, док је смањење активности забележено након третмана дериватима **3** и **4**. Добијени подаци указују на разлике у деловању одабраних деривата хидантона на активацију ова два сигнална пута. С обзиром да је у нашој студији детектован интензиван антипролиферативни и про-апоптотски ефекат тестираних деривата, и имајући у виду да JNK сигнални пут представља један од есенцијалних механизма регулације ћелијског циклуса и преживљавања, претпоставка је да је један од значајних механизма антитуморског деловања испитиваних деривати хидантоина и интерференција са JNK сигналном каскадом. Како деривати (**3** и **4**) нове серије хидантоина испитиване у овој докторској дисертацији показују интензивнији антипролиферативни и про-апоптотски ефекат у односу на дериват **0**, може се претпоставити да уочена диференцијална комбинација активације JNK киназа погодује унапређењу антитуморских својстава ове серије синтетисаних деривата.

Друга велика група MAPK присутних у ћелијама сисара су ERK киназе које су важне за адекватан одговор ћелије на екстрацелуларне сигнале и оне се активирају, како у нормалном ћелијском метаболизму, тако и у туморогенези и прогресији тумора (Cargnello и Roux, 2011). ERK представљају најчешћи сигнални таргет антитуморских терапеутика, иако и остали MAPK сигнални путеви активирани стресом (JNK и p38 киназе), као и метаболички и епигенетски фактори такође могу да утичу на модулацију одговора туморских ћелија на примењене хемиотерапеутике (Halasz и сар., 2016).

У студији су испитивани ефекти синтетисаних деривата на однос фосфорилисане и тоталне форме ERK1/2 киназе у HCT-116 ћелијама. Добијени резултати имуноблот анализе показују да постоји значајно смањење односа ове две форме киназа ERK1/2 у HCT-116 ћелијама након третмана свим испитиваним концентрацијама, осим након третмана дериватом **0** у нижој испитиваној концентрацији од 1  $\mu\text{M}$ , у односу на вредности у контролним нетретираним ћелијама. Овај резултат свакако указује да третман испитиваним дериватима значајно снижава сигналну каскаду посредовану ERK сигналним путем. Укупни

ниво ERK2, као и његова фосфорилисана форма су детектовани и утврђено је повећање обе форме код HCT-116 ћелија, док код MDA-MB-231 ћелија није детектована фосфорилисана форма, а тотални ERK2 садржај је снижен у свим тестираним једињењима у односу на контролу, што указује да су регистровани антитуморски ефекти у овој студији остварени преко интерференције са ERK2 сигналним путем.

ROS су укључене у разне физиолошке и патолошке процесе у ћелији (Hancock и сар., 2001; Dickinson и сар., 2011). Продукција ROS је физиолошки процес својствен свим аеробним организмима услед активности респираторног ланца у митохондријама (Сапо и сар., 2014). Оксидативни стрес представља неравнотежу између производње ових агресивних радикала и њихове неутрализације компензацијским антиоксидативним механизмима, што може довести до вишеструких ћелијских оштећења и до развоја различитих болести, укључујући и туморе (Waris и Ahsan, 2006; Jie и сар., 2013; Naziroglu, 2015). ROS индукују туморогенезу генетским и епигенетским механизмима, а повишен ниво ROS откривен у бројним туморима што јасно указује на њихову улогу у оштећењу ДНК која може довести до развоја и раста тумора (Liou и Storz, 2010).

Забележено је да сигнална каскада покренута оксидативним стресом утиче на све карактеристике понашања туморских ћелија (Szatrowski и Nathan, 1991; Storz, 2005; Gupta и сар., 2012). На пример, ROS у туморима је укључен у прогресију ћелијског циклуса и пролиферацију, преживљавање ћелија и инхибицију апоптозе, енергетски метаболизам, морфологију и покретљивост ћелија, међућелијску комуникацију, ангиогенезу и одржавање стабилности тумора. У туморским ћелијама дојке, инхибиција митохондријског унипортера блокира стварање ROS и смањује пролиферацију естроген зависних ћелија, што указује на улогу ROS продукованих од стране митохондрија у расту тумора (Parkash и сар., 2006).

Литературни подаци сугеришу присуство повишених нивоа реактивних радикала и ослабљену ефикасност антиоксидативног система одбране у туморским ћелијама (Trachootham и сар., 2009). У експериментима са различитим ћелијским линијама тумора примећена је позитивна корелација између високог нивоа оксидативног стреса и повећане пролиферације малигнућих ћелија, док примена антиоксидативних молекула смањује или инхибира пролиферацију ових ћелија (Behrend и сар., 2003; Liou и Storz, 2010).

Ови подаци су у складу са трендовима добијеним у нашој студији. Антиоксидативни ефекти које су испољили сви тестирани деривати, у свим примењеним концентрацијама сугеришу снажан ефекат смањења концентрације ROS-а ка смањењу активације ERK сигналне каскаде. Активација ERK сигналног пута у туморима функционално је повезана са повећаним степеном пролиферација ћелија (Khavari и Rinn, 2007; Roberts и Der, 2007). На пример, у ћелијама тумора дојке, ERK сигнални пут је активиран водоник пероксидом који је нус продукт током метаболизма естрогена, чиме се повећава пролиферација ћелија (Iraní и сар., 1997; Reddy и Glaros, 2007). Познато је неколико механизма помоћу којих ROS активирају ERK сигналне путеве. На пример, Ras, који је узводни активатор ERK киназа, може се активирати директно модификацијом на бочној групи цистеина на позицији 118, што доводи до инхибиције размене GDP/GTP (Lander и сар., 1997). ROS такође активира узводне киназе ERK сигналног пута као што је p90RSK. Недавно је показано да услед акумулације ROS у туморским ћелијама јајника, може доћи до деградације MAPK3 (митоген-активирани протеин киназе фосфатазе 3), фосфатазе која негативно регулише активност ERK сигналног пута (McCubrey и сар., 2007; Chan и сар., 2008). Последице долази до активације овог сигналног пута, прогресије и повећане резистенције туморских ћелија (нпр. тумор јајника, тумор дојке, меланома и леукемије). Активација ERK сигналне каскаде путем ROS

поспешује преживљавање туморских ћелија, раст независан од контакта, као и покретљивост (Roberts и Der, 2007; McCubrey и сар., 2007; Steelman и сар., 2008). Значајна инхибиција активности ERK сигналног пута изазвана тестираним дериватима хидантоина, може да буде последица њиховог израженог антиоксидативног ефекта и ремећења регулаторних функција ROS-а. Антипролиферативни исход третмана такође је у сагласности са овим директним и индиректним ефектима ROS-а.

Сматра се да су ROS претежно инхибиторни сигнали за развој тумора (Ramsey и Sharpless, 2006). Како ROS може имати две различите функције у терапији тумора, и про- и анти-оксидативна терапија се препоручују у лечењу тумора у зависности од типа тумора (Pelicano и сар., 2004; Nyoudou и сар., 2006; Ozben, 2007; Nyoudou и сар., 2008). Неравнотежа редокс статуса повезана је и са самом патогенезом тумора. ROS има различите улоге у туморским ћелијама, попут преживљавања ћелија, пролиферације, ангиогенезе и метастаза (D'Autréaux и Toledano, 2007; Clerkin и сар., 2008; Ushio-Fukai и Nakamura, 2008). Иако ROS имају важну улогу у постизању опстанка и прогресије тумора, могу такође бити и важни окидачи апоптозе туморских ћелија (Medan и сар., 2005).

Утврђено је да туморске ћелије адекватно функционишу при повишеним нивоима ROS у поређењу са здравим ткивом, и нивои ROS-а су повишени код тумора дојке, дебелог црева, панкреаса, простате и других врста тумора (Vaquero и сар. 2004; Kumar и сар., 2008; Afanas'ev, 2011). ROS могу узроковати генетску нестабилност, најчешће као последицу оксидације пурина и пиримидина и стварања лабилних алкалија. Оксидативна оштећења која обично доводе до мутација повезана су са модификацијом GC базних парова и ове мутације су преваходно последица супституције овог нуклеотидног пара, а ређе делеција и инсерција (Waris и Ahsan, 2006). ROS имају кључну улогу у регулисању експресије гена повезаних са растом и преживљавањем туморских ћелија, ангиогенезом, инвазијом и метастским потенцијалом активацијом транскрипционих фактора укључујући NF-κB, AP-1 и хипоксијом индуковани фактор 1α (енгл. *Hypoxia-inducible factor 1α*, HIF-1α) (Gupta и сар., 2012).

Показано је да нарушавање редокс хомеостазе у ћелијском циклусу MCF-10A ћелија може допринети аберантној пролиферацији (Menon и сар., 2005). Третман MCF-10A ћелија одређеним антиоксидансима изазвао је одлагање прогресије циклуса из G1 у S фазу (Menon и сар., 2005). Надаље, спољашњи туморогени као натријум арсенит стимулише производњу ROS-а у ћелијама тумора дојке и потенцира напредовање S фазе и накнадну ћелијску пролиферацију (Ruiz-Ramos и сар., 2009). Реактивне врсте кисеоника могу да регулишу нивое иРНК за циклине који учествују у ћелијском циклусу чиме се убрзава прелазак из G1 у S фазу, укључујући циклин Б2, циклин Д3, циклин Е1 и циклин Е2 (Feltu и сар., 2005). У складу са резултатима добијеним у овој студији, пролонгирање S фазе ћелијског циклуса индуковано третманом тестираним дериватима хидантоина може бити у корелацији са њиховим антиоксидативним деловањем.

Селенохидантоини, деривати хидантоина у којима је један од атома замењен селеном, показују јаку антиоксидативну активност и могу се користити као ефикасни антиоксиданси (Ivanenkov и сар., 2016). Деривати хидантоина који су тестирани у овој студији показали су интензиван антиоксидативни потенцијал и значајно редуковали продукцију  $O_2^{\cdot -}$  као једне од главних компоненти ROS-а у HCT-116 ћелијској линији. Истакнуто је учешће ROS сигнализације у настанку метастаза тумора (Wu, 2006). Туморске ћелије производе велике количине  $H_2O_2$  које су повезане са неколико кључних промена у самом туморском ткиву. Поред тога, малигни фенотип туморских ћелија се може преокренути само смањењем ћелијских нивоа  $H_2O_2$  (López-Lázaro, 2007). У складу са овим подацима, резултати добијени у

овој студији показују да су сва испитивана једињења у свим испитиваним концентрацијама показала значајно смањење производње  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 ћелијама. Једињења **3** и **4** су показала најјачу редукцију концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у поређењу са другим испитиваним једињењима. Будући да производња  $H_2O_2$  зависи од нивоа  $O_2^{\cdot-}$ , ова усаглашеност је очекивана. Антиоксидативни потенцијал одређених једињења у корелацији је са њиховом структуром.

Сличан ефекат добијен је у овој студији са испитиваним дериватима хидантоина у свим испитиваним концентрацијама у MDA-MB-231 ћелијама је остварен значајнији инхибиторни ефекат на производњу  $O_2^{\cdot-}$  у односу ефекат у НСТ-116 ћелијама, што указује да тестирани деривати хидантоина имају израженији антиоксидативни ефекат на ћелије тумора дојке.

Азот оксид (NO) је важан сигнални молекул у бројним физиолошким и патолошким процесима са контроверзном улогом у туморогенези и прогресији тумора дебелог црева (Liu и сар., 2003). Уочено је да је експресија iNOS смањена у тумору дебелог црева како на животињским моделима тако и у узорцима хуманог ткива (Liu и сар., 2003). У зависности од концентрације и времена изложености, као и типа тумора NO може остварити анти- или про-туморски ефекат (Rigas и Williams, 2008). Сви третмани у овој студији индуковали су значајно повећање продукције NO од стране НСТ-116 ћелијама, док је индекс миграције третираних ћелија смањен. На основу ових података, може се претпоставити да је један од механизма којим испитивани деривати смањују миграциони потенцијал ћелија тумора дебелог црева повећање биорасположивости NO. Овај молекул је укључен у регулацију експресије и функције молекула ћелијске адхезије, важних за покретљивост ћелија (Lee и сар., 2000). Повећани ниво NO може се делимично објаснити чињеницом да NO има полуживот од само неколико секунди у окружењу богатом супероксид анјон радикалом, док ниски нивои супероксид анјон радикала омогућавају његово продужено присуство (Pick и Keisari, 1980).

Овај молекул има важну улогу у различитим фазама туморогенезе, попут индукције оштећења ДНК, активирања онкогена, инхибиције ензима репарације ДНК и гена за супресију тумора и модулације апоптозе и метастазе (Fionda и сар., 2016). Различите улоге NO у апоптози, ћелијском циклусу, прогресији тумора, ангиогенези и метастазама најзначајније су на прелазу здравог и туморског ткива, јер је утврђено да је повишен ниво NO присутан на ивици туморског паренхима, као и у непосредном микроокружењу тумора (Vannini и сар., 2015). Микроокружење тумора укључује ћелије имунског система и васкуларног ткива, а NO је вероватно један од кључних фактора њихове активности (Artacho-Cordón и сар., 2012). Са друге стране антитуморски ефекти NO забележени су како код различитих тумора човека, тако и код тумора животиња (Choudhari и сар., 2013, Vahora и сар., 2016).

Ниске концентрације NO могу стимулисати раст ћелија и испољавати протективни ефекат на многе типове ћелија у смислу спречавања индукције апоптозе, док његове високе концентрације могу инхибирати раст ћелија и индуковати апоптозу (Kim и сар., 2001; Cook и сар., 2004). Ендогени донори NO инхибирали су епително-мезенхимску транзицију и инвазију хуманих метастатских ћелија ткива простате (Varitaki и сар., 2010). Показало се да виши нивои NO инхибирају настанка метастаза у различитим типовима тумора, што указује да је индукција генерисања NO корисна у антитуморским терапијским протоколима (Aranda и сар., 2012).



Како је утврђено да је NO јасно у корелацији са различитим туморима, ефекат NO кумулативно зависи од нивоа експресије гена за индуцибилну азот оксид синтетазу (*iNOS*), трајања интрацелуларног полуживота NO, микроокружења, генетске предиспозиције и типа ћелије (Cook и сар., 2004; Zhang и сар., 2012). Сходно томе, пошто сви испитивани деривати смањују ниво продукције  $O_2^-$ , повећана концентрација NO у свим третманима може бити директна последица тога. Супероксид анјон радикал реагује са NO и формира се пероксинитрит, па снажно смањење нивоа  $O_2^-$  значајно смањује степен формирања пероксинитрита повећавајући биорасположивост NO (Zhang и сар., 2007). Резултати ове докторске дисертације показују да су након продуженог третмана од 72 сата НСТ-116 ћелија одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**) дошло до значајног повећања експресије *iNOS* гена у поређењу са експресијом у нетретираним ћелија, што указује да се у основи повећања нивоа NO налази његова *de novo* синтеза и/или повећање његове биорасположивости.

Иако већина студија указује да NO има стимулативан ефекат на прогресију тумора, неке *in vitro* студије указују да су високи нивои NO генерисани трансфекцијом *iNOS* гена у туморским ћелијским линијама изазвали инхибиторне ефекте на раст, док је код животињских модела прекомерна *iNOS* експресија изазвала про- или анти-туморске ефекте, у зависности од туморског микроокружења и типа тумора (Bove и сар., 2008; Vannini и сар., 2015; Granados-Principial и сар., 2015). Како наши резултати јасно показују да испитивани деривати хидантоина, повећање продукције NO од стране MDA-MB-231 ћелијама индуковано новим дериватима хидантоина, један је од значајних антитуморских механизма тестираних деривата.

Многи антитуморски агенси су усмерени на индукцију експресије *iNOS*, неопходну за инхибицију раста и промоцију апоптозе метастатских туморских ћелија (Vannini и сар., 2015). Новосинтетисани деривати хидантоина тестирани у нашој студији повећали су ниво експресије *iNOS*-а за скоро 100% у поређењу са нивом у контролним нетретираним ћелијама, чиме се објашњава висока концентрацију NO забележена у студији. Ови подаци сугеришу да су деривати хидантоина јаки стимулатори синтезе NO чиме се могу, бар делимично објаснити њихова антипролиферативна и про-апоптотска својства. Резултати показују да је продужени третман одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**) у трајању од 72 сата MDA-MB-231 ћелија са изазвао статистички значајно повећање експресије *iNOS* у поређењу са експресијом у нетретираним ћелијама чиме се сугерише на значај дужине третмана у остваривању антитуморских својстава.

Испитивани деривати хидантоина показују ефекте на интраћелијске нивое глутатиона као једне од најважнијих неензимских, антиоксидативних компоненти ћелије. Глутатион и његова оксидована форма, GSSG, представљају важан маркер редокс статуса ћелија (Traverso и сар., 2013). У истраживањима спроведеним у овој докторској дисертацији је забележен повећан ниво тоталног глутатиона у ћелијама третираним свим тестираним дериватима, након сва три временска третмана (24, 48 и 72 сата). Најјачи ефекат међу свим тестираним дериватима показала су једињења **0**, **3** и **4** што је у корелацији са њиховим претходно приказаним антиоксидативним потенцијалом. Повишени нивои укупног и редукованог глутатиона детектовани су у овој студији, указују да су ови деривати хидантоина индуковали *de novo* синтезу GSH у ћелијама тумора што даље сугерише њихов антиоксидативни потенцијал (Zheng и сар., 2007; Majid и сар., 2013). GSH реагује са ROS-ом и/или функционише као кофактор антиоксидативних ензима, што има протективни ефекат на редокс-осетљиве молекуле. Смањени GSSG ниво и повишен однос GSH/2GSSG у третираним како НСТ-116 ћелијама, тако и MDA-MB-231 ћелијама указују на јак антиоксидативни потенцијал испитиваних једињења. Смањени ниво GSSG вероватно указује

на појачану производњу реактивних врста и/или стимулацију активности глутатион-редуктазе као важног антиоксидативног ензима. Ови подаци показују да деривати хидантоина који су испитивани у овој докторској дисертацији могу стимулисати антиоксидативне ћелијске капацитете и да синтеза GSH *de novo* може представљати један од механизма антитуморског ефекта ове серије деривата хидантоина.

ROS игра кључну улогу у многим ћелијским процесима неопходним за одржавање ћелијске хомеостазе, али такође може бити укључен у различите аспекте туморогенезе, као што је инвазија ћелија и метастаза (Liu и сар., 2017). Хемотактичка миграција и инвазија туморских ћелија у околно ткиво је пресудан корак у метастази тумора и многи терапијски приступи се заснивају на смањењу миграционих/инвазивних капацитета туморских ћелија (Gupta и Massagué, 2006).

Разни фактори су укључени у пролиферацију туморских ћелија, њихово преживљавање, инвазију и дисеминацију. Инфламација у туморском ткиву подстиче раст тумора и утиче на преживљавање ћелија тумора, а такође повећава и метастатски потенцијал тумора. У истраживању различитих механизма прогресије и метастаза тумора такође се истражују и ефекти антиинфламаторних лекова. Епидемиолошке студије су показале да је употреба NSAID повезана са смањеном учесталошћу неких врста тумора у популацији (Arun и Goss, 2004). Дугорочни корисници NSAID-а који имају тумор дебелог црева показали су ниже стопе смртности од корисника који нису користили NSAID (Rayburn и сар., 2009). Поред тога, показало се да ибупрофен и аспирин значајно смањују могућност развоја рецидива, стопу смртности и количину туморског ткива (Cruz-Correa и сар., 2002; Harris и сар., 2011). Утицаји NSAID на инхибицију раста тумора и спречавање настанка метастаза још увек нису у потпуности разјашњени (Umar и сар., 2016). Опште је прихваћено да је повећана продукција производње PG-а и цитокина у туморима повезана са њиховим метаболизмом, пролиферацијом, ангиогенезом, инвазивном способношћу, отпорношћу на апоптозу и сузбијањем антитуморског имунитета.

Миграциони потенцијал туморских ћелија је кључни аспект развоја тумора који је један од разлога за циљање способности покретљивости ћелија у различитим антитуморским стратегијама. Третман испитиваним дериватима хидантоина (једињења **0**, **3** и **4**) смањило је капацитет миграције HCT-116 ћелија. Третман концентрацијом од 1  $\mu\text{M}$  одабраних једињења изазвао је јачу инхибицију миграционог капацитета ћелија у поређењу са третманом вишом концентрацијом (10  $\mu\text{M}$ ). Овај ефекат може бити узрокован различитим путевима који су укључени у процесе покретљивости ћелија, а то су значајно смањењен ниво ROS-а и прекомерна продукција NO индукована *iNOS*-ом експримираним у третираним ћелијама. Експресија *iNOS*-а може бити индукована липополисахаридима и различитим цитокинима, а код различитих патолошких стања сматра се штетним ензимом (Jansen и сар., 2003). Описано је да је *iNOS* посредник у настанку метастаза код различитих типова тумора (Granados-Princípal и сар., 2015). Приказани подаци су показали да третмани одабраним дериватима смањују капацитет миграције HCT-116 ћелија док са друге стране повећавају производњу NO, што би могло да укаже на значајну улогу NO у механизмима миграције ових ћелија. Иако је у већини студија забележен ефекат NO на промовисање инвазије у различитим типовима ћелија, постоји неколико студија које су показале антимигранторне и антипролиферативне ефекте NO (Kim и сар., 2001; Vove и сар., 2008). На основу резултата који се односе на продукцију ROS-а приказаних у овој докторској дисертацији, можемо да закључимо да ниво ROS-а представља у ћелијама тумора значајни параметар потенцијала ћелијске миграције и инвазије, што је у складу са литературним подацима (Gupta и сар., 2012).

Третман са испитиваним дериватима хидантоина у нашој студији смањио је капацитет миграције MDA-MB-231 ћелија. На основу ових података, један од могућих механизма помоћу којих ова једињења смањују миграциони потенцијал ћелија хуманог тумора дојке је повећана биорасположивост NO. NO је укључен у регулацију молекула ћелијске адхезије, највећим делом интегрина, важних за сесилност и покретљивост ћелија (Roberts и сар., 2008). Један од кључних гена који одређује способност миграције туморских ћелија анализираних у нашој студији је iNOS који генерише NO у значајним количинама у ћелијама тумора дојке. Наши резултати су показали да је третман одабраним дериватима смањио капацитет миграције MDA-MB-231 ћелија, а са друге стране повишена производња NO би могла указати на улогу NO у механизмима миграције ових ћелија. Иако већина студија указује на ефекте NO на промовисање инвазије у различитим типовима ћелија, постоји неколико студија које су указале на антимиграторне и антипролиферативне ефекте NO (Aranda и сар., 2012).

Студија спроведена од стране Мајумдера и колега је имплицирала да је повишени ниво експресије COX-2 имао промовишући ефекат на капацитет миграције ћелија тумора дојке (Мајумдер и сар., 2016). У нашој студији смањени индекс миграције може бити узрокован смањењем нивоа експресије COX-2 у третманима. Дериват **4**, са хлоро-супституентом, показује највеће смањење миграционог потенцијала ових ћелија. Ови подаци сугеришу да су нови деривати хидантоина способни да смање миграцију ћелија тумора дојке што их чини обећавајућим антитуморским агенсима.

NSAID представљају групу од око 50 различитих лекова који се широко користе за третман инфламације и показују антипиретска и аналгетска својства. Већина NSAID показује низ штетних ефеката, посебно повезаних са гастроинтестиналним компликацијама, тако да за развој нових лекова у лечењу хроничне инфламације и бола и даље постоји велико интересовање. Познато је да хидантоин и деривати индола показују различита фармаколошка деловања, укључујући антиинфламаторне и аналгетске активности (Guerra и сар., 2011). Студија Guerra и сарадника указује на снажна потенцијална антиинфламаторна својства хибридних молекула који садрже имидазолско и индолско језгро. Резултати добијени у овој студији показују да тестирана једињења показују обећавајуће антиинфламаторне активности које вероватно укључују модулацију имунског система. Неке предходне студије су идентификовале молекуле који садрже језгра индола/имидазолидина као погодне терпеутике за лечење инфламације и бола (Kim и сар., 2006; Sudo и сар., 2010). Индометхацин, лек који је коришћен као позитивна контрола, је нестероидни анти-инфламаторни дериват индол сирћетне киселине који инхибира активност ензима циклооксигеназа, смањујући синтезу простагландина и тромбоксана из арахидонске киселине (Jurna и Brune, 1990). Овакви резултати, указују да ова једињења могу да се карактеришу сличним механизмом деловања; међутим, потребне су додатне студије.

COX-2 катализује конверзију слободне арахидонске киселине у простагландине, а производи који потичу од COX-1 покрећу почетну фазу акутне инфламације са регулацијом COX-2 која се одвија у року од неколико сати (Smyth и сар., 2009). COX-2 је ензим који се ослобађа на месту повреде ткива да би се створио простагландин E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) који је медијатор бола и инфламације. Циклооксигеназа даје два молекула кисеоника арахидонској киселини која се формира пероксидацијом, која се затим редукује до PGH<sub>2</sub>. Коначно, PGE<sub>2</sub> и други простагландини настају активацијом PGE синтетазе (Murakami и сар., 2007). COX-2 је индукован стимулусима као што је бактеријски ендотоксин и цитокини, и молекулски је таргет аналгетских и антиинфламаторних лекова. Повећани ниво COX-2 смањује

унутарћелијске нивое слободне арахидонске киселине, спречавајући тако апоптозу и олакшавајући раст туморских ћелија (Nagendrarabhu и сар., 2011).

Простагландин настао под деловањем COX-2 може поспешити раст тумора везивањем за његове рецепторе и активирањем сигналних путева који контролишу ћелијску пролиферацију (Alsaegh и сар., 2017), промовишу ангиогенезу (Ben-Av и сар., 1995, Tsuji и сар., 1998), инхибирају апоптозу и повећавају метастатски потенцијал (Kakiuchi и сар., 2002). У ћелијама тумора дојке, експресија COX-2 мења структуру и функцију екстрацелуларног простора и број фибробласта придружених тумору (Krishnamachary и сар., 2017). COX-2 је такође повезан са трансформацијом нормалне строме у „реактивни“ стромални фенотип. PPAR $\gamma$ , COX-2 и p-I $\kappa$ B- $\alpha$  имају важне улоге у овом стромалном ремодиловању (Vandoros и сар., 2006). Повишена експресија COX-2 експримирана је у различитим туморима, укључујући туморе желуца, јетре, једњака, панкреаса, главе и врата, плућа, дојке, бешике, грлића материце, ендометријалне, коже и дебелог црева у односу на немалигно, здраво ткиво (Koki и сар., 2002).

COX-2 је индуцибилан ензим и његов ниво повишен је када дође до оштећења ткива. Значајно је да је прекомерна експресија COX-2 у корелацији са високим нивоом унутарћелијске теломеразе- виталног ензима реверзне транскриптазе који је повезан са повећаном пролиферацијом ћелија и смањеном апоптозом (Harris и сар., 2011). Циклооксигеназа-2 (COX-2) је често прекомерно изражена у туморским ћелијама дојке (Chow и сар., 2008). Континуирана и прекомерна експресија COX-2 може покренути и промовисати туморогенезу: (1) повећањем производње реактивних врста кисеоника које су туморогене (мутагенеза); (2) повећање производње PGE<sub>2</sub> и других фактора који снажно промовишу ћелијску пролиферацију (митогенеза); (3) стимулација VEGF и PDGF преко PGE<sub>2</sub> што резултира формирањем крвних судова (ангиогенеза); (4) повећање производње металопроотеиназа, чиме се повећава инвазивни потенцијал (метастазе); (5) смањење биорасположивих резерви арахидонске киселине, чиме се смањује диференцијација ћелија и апоптоза (анти-апоптоза); и (6) инхибирање пролиферације Б и Т лимфоцита, посебно природних Т ћелија убица, чиме се ограничава антинеопластична активност (имуносупресија) (Harris и сар., 2014).

COX-2 инхибитори дизајнирани су да блокирају активност ензима COX-2 и ублаже бол. Фосфолипиди се трансформишу у арахидонску киселину као одговор на повреду ткива и затим се даље трансформишу у PGE<sub>2</sub> помоћу COX ензима. Нека клиничка испитивања за неколико малигну оболјења показала су да селективни инхибитори COX-2, посебно целекоксиб, имају потенцијално протективни ефекат на развој тумора (Gong и сар., 2012). У туморогенези примећена је транскрипциона регулација гена COX-2 у колоректалним аденомима, док COX-1 није експримиран (Kargman и сар., 1995). Ниво COX-2 у тумору дебелог црева и појачана PGE<sub>2</sub> сигнализација путем PGE-EP рецептора је 3-4 пута већа од оног у здравом ткиву (Dixon и сар., 2013). Показано је у другим истраживањима да PGE<sub>2</sub> инхибира апоптозу и подстиче раст и ангиогенезу тумора активацијом транскрипције зависне од  $\beta$ -катенина (Shao и сар., 2005). Познати инхибиторни ефекти NSAIDs циклооксигеназних путева подстакли су многа истраживања ових молекула у туморским ћелијама. Студије показују да инхибира активацију NF- $\kappa$ B ацетил салицилном киселином без ометања транскрипције гена.

Литературни подаци показују да COX-2 може играти улогу у различитим фазама прогресије тумора поспешивањем пролиферације мутираних ћелија, и/или инхибицијом њихове апоптозе утичући на ефикасност антитуморских терапија (Сао и Prescott, 2002).

Његова улога је такође укључена у формирање метастаза, утичући на апоптозу изазвану губитком ћелијског контакта (Sobolewski и сар., 2010). Инфламаторни молекули и фактори који су укључени у зарастање рана сматрају се кључним регулаторним сигнаlima у бројним моделима туморогенезе (Coussens и Werb, 2002; Philip и сар., 2004). Показано је да индуцибилна изоформа циклооксигеназе, COX-2, представља индикативну везу између инфламације и прогресије многих типова тумора, укључујући тумор дојке. Сходно томе, многе савремене хемиотерапије су усмерене на смањену активност COX-2 (Koki и сар., 2002; Hashemi и сар., 2019). Истраживања указују на то да метаболити који настају из COX-2 могу допринети одржавању туморске виталности, премалигне хиперпролиферације, раста тумора, трансформације, инвазије и метастатског ширења (Hashemi и сар., 2019). Претерана експресија COX-2 сматра се свеprisутним индуктором туморогенезе дојке и чини се да његова инхибиција има огроман значај у превенцији и терапији тумора дојке (Singh-Ranger и Mokbel, 2002). Литературни подаци показују да COX-инхибитори могу смањити ефикасност евазије туморског ткива од деловања имунског система, што представља појачање стандардне цитотоксичне терапије (Liu и сар., 2015).

Прекомерна експресија COX-2 откривена је код тумора дебелог црева, дојке, панкреаса и плућа, где корелира са лошом клиничком прогнозом (Sobolewski и сар., 2010; Liu и сар., 2015). COX-2 и простагландински каскадни путеви играју важну улогу у “инфламацији тумора” (Liu и сар., 2015). Наши резултати показују да је третман дериватима хидантоина **0**, **3** и **4** узроковао статистички значајно смањење експресије COX-2 гена у односу на нетретиране НСТ-116 ћелије, и једињења **3** и **4** су показала јачу редукцију COX-2 експресије гена. Ови резултати указују да сва три једињења смањују овај параметар инфламације који би могао бити један од могућих механизма њихове антитуморске активности. COX-2 је важан у колоректалној туморогенези и сама веза са NO је проучавана код тумора дебелог црева (Liu и сар., 2003). NO има регулаторни ефекат, било стимулативни или инхибиторни, на ниво експресије и активности ензима COX-2 гена (Weinberg, 2000; Pérez-Sala и Lamas, 2001). Редукција нивоа експресије COX-2 гена у поређењу са контролним ћелијама је јача у концентрацији од 1  $\mu\text{M}$  у поређењу са 10  $\mu\text{M}$ , што може бити последица дозно-зависног повишења нивоа NO изазваног третманом.

Иако је употреба NSAID повезана са смањеном инфламацијом тумора, а посебно тумора дојке (Bowers и сар., 2014), њихове штетне нуспојаве забележене су због ниске селективности (Bundred и Barnes, 2005). Употреба нових селективних инхибитора COX-2, као што су Coxibs и NO-ослобађајући NSAID може пружити задовољавајуће антиинфламаторне ефекте и бити лишена нежељених ефеката повезаних са класичним, неселективним NSAID (Arup и Goss, 2004; Tołoczko-Iwaniuk и сар., 2019). Неке недавне студије указују на истакнуто место селективних инхибитора COX-2 у превенцији различитих тумора, укључујући тумор дојке (Mazhar и сар., 2005, Takkouche и сар., 2008, Regulski и сар., 2016).

Одређена хидантоински деривати као што су 5,5-диарилхидантоински деривати су показала селективну инхибицију COX-2 ензима (Zarghi и сар., 2011). Наши резултати показују да су једињења **0**, **3** и **4** статистички значајно смањила експресију COX-2 гена у односу на нетретиране ћелије, што додатно може промовисати један од могућих начина њиховог антитуморског деловања (Mehner и сар., 2014).

Екстрацелуларне протеиназе су кључне за метастазу јер ови ензими разграђују компоненте екстрацелуларног матрикса и лабаве поремећај међућелијских адхезија, одвајајући појединачне ћелије од солидне туморске масе (Herszényi и сар., 2014). Међу

породицом матриксних металопротеиназа, познато је да MMP-9 значајно регулише прогресију скоро свих типова тумора, укључујући тумор дојке (Taguchi и сар., 2014). Експресија MMP-9 је у позитивној корелацији са стадијумом, степеном и прогнозом тумора, што га чини погодним маркером и потенцијалним терапијским циљем за спречавање инвазије и метастазе тумора дојке (Roy и сар., 2009, Alaseem и сар., 2019).

Металопротеиназе представљају кључне ензиме у инвазији тумора, такође активне у нормалним ћелијама током процеса ремоделирања ткива (Kessenbrock и сар., 2015). Инхибиција MMP је кључна мета бројних стратегија за терапију тумора. Улога MMP-а као биомаркера у стадијима тумора дебелог црева и њиховој употреби у праћењу терапијских одговора код различитих појединаца на хемиотерапијски режим, чине ове молекуле атрактивним циљем у развоју ефикаснијих хемиотерапијских приступа (Said и сар., 2014). Резултати указују да продужени третман од 72 сата на НСТ-116 ћелијама трима одабраним дериватима хидантоина (**0**, **3** и **4**) доводи до статистички значајног смањења експресије иРНК за MMP-9 у поређењу са експресијом контролним ћелијама, док су деривати **3** и **4** показали јачу редукцију експресије MMP-9. Ови подаци указују на то да ови деривати имају значајан потенцијал за смањење капацитета инвазије НСТ-116 ћелија, као и да је нова серија супериорнија у односу на предходне модификације.

MMP директно модификују интегрине и друге молекуле ћелијске адхезије, и протеолитички активирају цитокине као што је TGF- $\beta$ , што доводи до индукције епително-мезенхимске транзиције, свеобухватне фенотипске алтерације карактерисане појачаном покретљивошћу ћелија (Mehner и сар., 2014). MMP-9, такође позната као желатиназа Б, снажно је повезана са агресивним и метастатским тумором дојке (Mehner и сар., 2014). MMP-9 и остале MMP као биомаркери стадијума тумора дојке користе се у праћењу терапијских одговора код различитих појединаца за процену ефикасности одређеног хемиотерапијског режима (Said и сар., 2014).

Резултати нашег истраживања показали су продужени третман од 72 сата на MDA-MB-231 ћелијама одабраним дериватима (**0**, **3** и **4**) доводи до статистички значајног смањења нивоа експресије MMP-9 у односу на контролне ћелије, што сугерише да ова једињења могу смањити капацитет инвазије MDA-MB-231 ћелија тако што регулишу експресију MMP-9. Добијени подаци говоре да MMP-9 игра важну улогу у прогресији тумора дојке, јер је укључена у покретање инвазивности ћелија тумора дојке (Duffy и сар., 2000).

Упркос различитим новим терапијским приступима, хемиотерапија остаје најчешћи облик лечења тумора дебелог црева и тумора дојке, са значајним ограничењима у погледу прекомерне токсичности уобичајено употребљаваних хемиотерапеутика и значајне отпорности туморских ћелија. Испитивани синтетисани деривати хидантоина показали су значајну антитуморску активност код ћелија тумора дебелог црева, НСТ-116 ћелије, као и код тумора дојке, MDA-MB-231 ћелије, кроз различите параметре. Сва тестирана једињења су показала значајан антипролиферативни, про-апоптотски и антиоксидативни ефекат код НСТ-116 ћелија, у дозној и временској зависности као један од најважнијих антитуморских механизма, тако и код MDA-MB-231 ћелија. Ова једињења су изазвала смањење миграције ћелија и капацитета инвазије и показала значајну селективност у инхибицији пролиферације између туморских и немалигних (здравих) ћелија код обе ћелијске линије. На основу наших резултата, нови деривати хидантоина су показали јачи антитуморски ефекат у хуманим НСТ-116 ћелијама у поређењу са дериватом **0** из претходне студије, што сугерише да замена фенил групе изопропилном групом у положају 5 на хидантоинском језгру може појачати инхибиторне ефекте ове класе једињења према тумору дебелог црева. Сличан ефекат

деривати хидантоина показали су и на MDA-MB-231 ћелијама. Компаративне студије са NSAID селективним инхибиторима циклооксигеназа тек треба да буду изведене, али можемо сугерисати да су ови нови деривати хидантоина обећавајући агенси у смањењу производње простагландина у ћелијама тумора дојке MDA-MB-231 са потенцијано сниженим нежељеним ефектима. Ове карактеристике деривата хидантоина код обе ћелијске линије чине ове молекуле перспективним кандидатима за даља истраживања у *in vivo* животињским моделима, са циљем развоја ефикаснијих антитуморских лекова.

## **6. Закључци**



На основу резултата испитивања биолошких ефеката серије **3-супституисаних-5-изопропил-5-фенил** деривата хидантоина на индекс пролиферације, нивое апоптозе, активност каспаза, прогресију ћелијског циклуса, оксидативно/антиоксидативну равнотежу, производњу NO и потенцијал миграције/инвазије ћелија хуманог тумора дебелог црева, НСТ-116, и ћелија тумора дојке, MDA-MB-231, добијених током израде ове докторске дисертације, могу се извести следећи закључци:

- Сви испитивани деривати хидантоина показали су задовољавајућу биокомпатибилност, што их је кандидовало за испитивања као антитуморских терапеутика у третману ћелија тумора дебелог црева, НСТ-116 и тумора дојке, MDA-MB-231 у *in vitro* условима.
- Серија деривата **3-супституисаних-5-изопропил-5-фенил хидантоина** у концентрацијама од 0,01  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  у сва три испитивана временска третмана (24 h, 48 h и 72 h) показује антипролиферативни ефекат према обе коришћене ћелијске линије. Сви синтетисани деривати ове серије хидантоина показали су интензивнију антипролиферативну активност у односу на полазни дериват **0** након продуженог третмана (72 сата). Деривати **3** и **4** показују најјачи антипролиферативни ефекат према ћелијама тумора дебелог црева у читавој серији испитиваних деривата, док је дериват **4** са хлоро-супституентом показао најјачи антипролиферативни ефекат према ћелијама тумора дојке. Запажа се већа осетљивост НСТ-116 ћелија на третман испитиваним дериватима, у односу на ефекте према MDA-MB-231 ћелијама.
- Дејство одабраних (**0**, **3** и **4**) синтетисаних деривата хидантоина у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  према испитиваним туморским ћелијама има највећи потенцијал и огледа се у способности да индукују апоптозу и инхибирају прогресију ћелијског циклуса. Поређењем испитиваних ћелијских линија, запажа се већа осетљивост MDA-MB-231 ћелија на испитиване третмане у односу на НСТ-116 ћелије. Дериват **4** показао је најизраженији про-апоптотски ефекат након 72 сата третмана MDA-MB-231 ћелија у односу на ефекат третмана другим дериватима, као у поређењу са ефектима свих одабраних деривата према НСТ-116 ћелијама.
- Промене концентрација параметара оксидативног/антиоксидативног статуса у туморским ћелијама су биле значајне након третмана новосинтетисаним дериватима хидантоина у концентрацијама од 0,01  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  у сва три испитивана временска третмана. Након третмана региструје се статистички значајан пораст нитрита и интензивно смањење концентрације супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^-$ ). Концентрације неензимских параметара антиоксидативне заштите (GSH и GSSG) се мењају у таквом тренду да указују на значајан антиоксидативни потенцијал испитиваних деривата хидантоина у третманима хуманих ћелијских линија тумора дебелог црева и тумора дојке.

- Испитивани деривати хидантоина који су показали најбољу антипролиферативну активност **0, 3 и 4** у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у сва три временска третмана су успорили миграцију туморских ћелија. Миграциони потенцијал туморских ћелија је кључни аспект развоја тумора стога је управо ово један од циљева у различитим антитуморским стратегијама. Третман испитиваним дериватима хидантоина (**0, 3 и 4**) смањено је капацитет миграције НСТ-116 ћелија. Третман концентрацијом од 1  $\mu\text{M}$  одабраних деривата изазвао је јачу инхибицију миграционог капацитета ћелија у поређењу са резултатом након третмана вишом концентрацијом (10  $\mu\text{M}$ ). Овај ефекат може бити узрокован различитим путевима који су укључени у процесе покретљивости ћелија, а то су значајно смањен ниво ROS-а и прекомерна продукција NO индукована *iNOS*-ом присутним у третираним ћелијама. ROS игра кључну улогу у многим ћелијским процесима неопходним за одржавање ћелијске хомеостазе, али такође може бити укључен у различите аспекте туморогенезе, као што је инвазија ћелија и метастаза.
- Експресиони нивои гена за индуцибилну азот оксид синтетазу (*iNOS*), су повећани под деловањем одабраних деривата хидантоина (**0, 3 и 4**) у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током третмана у трајању од 72 сата.
- Ниво експресије *COX-2* гена који је укључен у регулацију миграционих и инвазионих способности туморских ћелија, је смањен након третмана испитиваних туморских ћелија одабраним дериватима хидантоина (**0, 3 и 4**) у поређењу са експресијом у контролним нетретираним ћелијама. Овај налаз указује да је један од механизма антитуморског деловања ових деривата смањење нивоа експресије *COX-2*, који је у вези са уоченим смањеним капацитетом инвазије третираних туморских ћелија.
- Након продуженог третмана (72 сата) одабраним дериватима хидантоина (**0, 3 и 4**) у концентрацијама 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  дошло је до смањења нивоа експресије *MMP-9* у испитиваним ћелијама. Имајући у виду да *MMP-9* игра важну улогу у прогресији тумора дојке, односно инвазивности ћелија тумора дојке, добијени резултати указују на потенцијал ових деривата у смањењу капацитета инвазије MDA-MB-231 ћелија.
- Испитивани деривати (**3 и 4**) показали су интензиван антипролиферативни и про-апоптски ефекат на MDA-MB-231 ћелије у односу на дериват **0**. Имајући у виду да JNK сигнални пут представља један од есенцијалних механизма регулације ћелијског циклуса и преживљавања, можемо закључити да се антитуморски механизам испитиваних деривата хидантоина заснива на интеракцији са JNK сигналном каскадом. Показано је да добијена диференцијална комбинација активације JNK киназа погодује унапређеним антитуморским својствима синтетисаних деривата.

- Испитивањем дејства одабраних деривата на однос фосфорилисане и тоталне форме ERK1/2 киназе код НСТ-116 ћелија, показано је да постоји значајно смањење односа ове две форме киназа ERK1/2 у готово свим испитиваним концентрацијама у односу на контролне вредности, што доводи до закључка да третман испитиваним дериватима значајно снижава сигналну каскаду посредовану ERK сигналним путем.
- На основу добијених резултата, показано је да новосинтетисани деривати хидантоина испољавају јачи антитуморски ефекат према хуманим НСТ-116 ћелијама у поређењу са полазним дериватом **0**, што сугерише да замена фенил групе изопропилном групом може појачати инхибиторне ефекте испитиваних деривата на тумор дебелог црева. Сличан ефекат деривати хидантоина показали су и према MDA-MB-231 ћелијама. Ове карактеристике испитиваних деривата хидантоина испољене према обе ћелијске линије чине их перспективним кандидатима за даља истраживања у *in vivo* животињским моделима, са циљем развоја ефикаснијих антитуморских лекова.

## **7. Литература**

Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Osnovna imunologija, 6. izdanje, Beograd, Data Status, 2019.

Abdel-Rahman WM, Peltomaki P. Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. *Ann Med* 2004; 36: 379-388.

Adrain C, Martin SJ. Apoptosis: calling time on apoptosome activity. *Sci Signal* 2009; 2: 62.

Afanas'ev I. Reactive Oxygen Species Signaling in Cancer: Comparison With Aging. *Aging Dis* 2011; 2(3): 219-30.

Akagah B, Lormier AT, Fournet A, Figadere B. Oxidation of antiparasitic 2-substituted quinolines using metalloporphyrin catalysts: scale-up of a biomimetic reaction for metabolite production of drug candidates. *Org Biomol Chem* 2008; 6: 4494-4497.

Alaseem, A., Alhazzani, K., Dondapati, P., Alobid, S., Bishayee, A., Rathinavelu, A. Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Semin. Cancer. Biol.* 2019; 56: 100-115.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.

Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, Bashir AHH, Mohammed OY, Elhassan GO, Harguindey S, Reshkin SJ, Ibrahim ME, Rauch C. Resistance to Cancer Chemotherapy: Failure in Drug Response From ADME to P-gp. *Cancer Cell Int* 2015; 15: 71.

Alsaegh MA, Miyashita H, Taniguchi T, Zhu SR. Odontogenic epithelial proliferation is correlated with COX-2 expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. *Exp Ther Med.* 2017; 13(1): 247-253.

Anger T, Madge DJ, Mulla M, Riddall D. Medicinal chemistry of neuronal voltage-gated sodium channel blockers. *J Med Chem.* 2001; 44(2): 115-137.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 2014; 5:196.

Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, Shiseki MP, Miura K, Harris CC. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and Ras pathways. *Cancer Res* 2003; 63: 728-734.

Aranda E, Lopez-Pedrerera C, De La Haba-Rodriguez JR, Rodriguez-Ariza A. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. *Curr Mol Med.* 2012; 12: 50-67.

Artacho-Cordón A, Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Calvente I, Núñez MI. Tumor microenvironment and breast cancer progression: a complex scenario. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13: 14-24.

Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol* 2004; 31(2 Suppl 7): 22-9.

Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction, in Greenwald, R. A. (Eds.), Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, BocaRaton, CRC Press.1985; pp. 123-132.

Baggiolini M, Thelen M. The phagocytes and respiratory burst. In: Sies H, ed. Oxidative stress. Oxidants and antioxidants. London: Academic Press. 1991. pp. 399-420.

Bai L, Zhu WG. p53: structure, function and therapeutic applications. J Cancer Mol 2006, 2(4):141-153.

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem*, 1990; 190: 360-365.

Ballatori N. Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol* 1994; 27: 271–298.

Baritaki S, Huerta-Yepez S, Sahakyan A, Karagiannides I, Bakirtzi K, Jazirehi A. Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis-inducer snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP. *Cell Cycle*. 2010; 9:4931–4940.

Basappa, Ananda Kumar CS, Nanjunda Swamy S, Sugahara K, Rangappa KS. Anti-tumor and anti-angiogenic activity of novel hydantoin derivatives: Inhibition of VEGF secretion in liver metastatic osteosarcoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(14): 4928-4934.

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *BiochemSoc Trans* 2003; 31: 1441-4.

Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*. 1995;372(1):83–87

Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* 2012; 5(1), 9–19.

Bogoyevitch MA, Ngoei K RW, Zhao TT, Yeap YC, Dominic C.H.Ng. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2010; 3:463-475.

Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Neurological Disorders and Stroke: Therapeutic Implications. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(14): 1299-315.

Boranić M. Etiologija i patogeneza tumora dojke. *Med Vjesn* 2006; 38(1-4): 33-42.

Bove PF, Hristova M, Wesley UV, Olson N, Lounsbury KM, van der Vliet A. Inflammatory levels of nitric oxide inhibit airway epithelial cell migration by inhibition of the kinase ERK1/2 and activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Biol Chem*. 2008;283(26):17919-17928.

Bowers LW, Maximo IXF, Brenner AJ, Beeram, M, Hursting SD, Price RS, Tekmal, RR, Jolly CA, deGraffenried LA. NSAID use reduces breast cancer recurrence in overweight and obese women: role of prostaglandin-aromatase interactions. *Cancer. Res.* 2014; 74, 4446-4457.

Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cell Tissues Organs* 2005; 179(1-2): 56-65.

Bundred NJ, Barnes, NL. Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer. *Br. J. Cancer* 2005; 93, Suppl 1: S10-5.

Camerman A, Camerman N. Diphenylhydantoin and diazepam: molecular structure similarities and steric basis of anticonvulsant activity. *Science* 1970; 168: 1457-1458.

Camerman A, Camerman N. Stereochemical basis of anticonvulsant drug action. II. Molecular structure of diazepam. *J Am Chem Soc* 1972; 94: 268-72.

Cano I, Selivanov V, Gomez-Cabrero D, Tegnér J, Roca J, Wagner PD, Cascante M. Oxygen pathway modeling estimates high reactive oxygen species production above the highest permanent human habitation. *PLoS One* 2014; 9(11): e111068.

Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002;190: 279-86.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [published correction appears in *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012 Jun;76(2):496]. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011;75(1):50-83.

Carmi C, Cavazzoni A, Zuliani V, Lodola A, Bordi F, Plazzi PV, Mor M. 5-Benzylidenehydantoins as new EGFR inhibitors with anti-proliferative activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 4021-4025.

Cavazzoni A, Alfieri RR, Carmi C, Zuliani V, Galetti M, Fumarola C, Frazzi R, Bonelli M, Bordi F, Lodola A, Mor M, Petronini PG. Dual mechanisms of action of the 5-benzylidenehydantoin UPR1024 on lung cancer cell lines. *Molec Can Therap* 2008; 7: 361-370.

Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:274-282.

Chan DW, Liu VW, Tsao GS, et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1742-1750.

Chandrasekharan NV, Dai H, Lamar K, Roos T, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002; 99(21): 13926-13931.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer immunity cycle. *Immunity* 2013; 39: 1-10.

- Chen HX, Cleck JN. Adverse Effects of Anticancer Agents That Target the VEGF Pathway. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6(8): 465-77.
- Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T: A human IAP family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 264:847-854.
- Chen HC. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol* 2005; 294:15-22.
- Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transformng Growth Factor-Beta Signaling-Deficient Fibroblast Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Mol Cancer Res* 2008; 6(10): 1521-33.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Choudhari SK, Chaudhary M, Sachin Bagde S, Gadbai AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review *World J Surg Oncol*. 2013; 11: 118.
- Chow LW, Yip AY, Loo WT, Lam CK, Toi M. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer. *J Steroid.Biochem Mol Biol* 2008;111:13–17.
- Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1440-1452.
- Christiansen J, Rajasekaran A. Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastatsis, *Cancer Res* 2006; 66(17): 8319-26.
- Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, AretiniP, Bonatti F, Brunetti I, Bruno M, Lombardi G, Schittulli F, Sensi E. Genetic alterations in heraditary breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 17-13.
- Clark AG, Matić Vignjević D. Models of Cancer Cell Invasion and the Role of the Microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 36: 13-22.
- Clerkin JS, Naughton R, Quiney C, Cotter TG. Mechanism of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008; 266(1): 30-36.
- Cook T, Wang Z, Alber S, Liu K, Watkins SC, Vodovotz Y, Billiar TR, Blumberg D. Nitric Oxide and Ionizing Radiation Synergistically Promote Apoptosis and Growth Inhibition of Cancer by Activating p53. *Canc Rese* 2004; 64: 8015-8021.
- Cooper CE, Patel RP, Brookes PS, Darley-USmar VM. Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *TRENDS Biochem Sci* 2002; 27: 489-492.
- Corrêa Lima MP, Gomes-da-Silva MHG. Colorectal cancer: lifestyle and dietary factors. *Nutr Hosp* 2005; (4): 235-241.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420:860–867.



- Cruz-Correa M, Hyland LM, Romans KE, Booker SV, Giardiello FM. Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: a prospective cohort study. *Gastroenterology*. 2002; 122(3): 641-645.
- D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 813-24.
- Dargel R. Lipid peroxidation - a common pathogenic mechanism? *Exp Toxicol Pathol* 1991; 44: 169-181.
- Darwich AS, Pade D, Ammori BJ, Masoud J, Ashcroft DM, Rostami-Hodjegan A. A mechanistic pharmacokinetic model to assess modified oral drug bioavailability post bariatric surgery in morbidly obese patients: interplay between CYP3A gut wall metabolism, permeability and dissolution. *J Phar And Pharmaco* 2012; 64: 1008-1024.
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000; 103(2):239-252.
- Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3185-3202.
- Dhanasekaran M, Tharakan B, Holcomb LA, Hitt AR, Young KA, Manyam BV, Gurpinar E, William E, Grizzle W E, Gary A, Piazza G A. COX-independent mechanisms of cancer chemoprevention by anti-inflammatory drugs. *Front Oncol* 2013; 3: 1-18
- Dickinson, Christopher, Chang. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. 2011 18; 7(8): 504-11.
- Dixon DA, Balch GC, Kedersha N, Anderson P, Zimmerman GA, Beauchamp RD, Prescott SM. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J Exp Med* 2003; 198: 475-481.
- Dixon DA, Blanco FF, Bruno A, Patrignani P. Mechanistic aspects of COX-2 expression in colorectal neoplasia. *Recent Results Cancer Res*. 2013; 191:7-37.
- Dooher JE, Paz-Priel I, Houng S, Baldwin AS Jr, Friedman AD. C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\alpha$  Oncoproteins, or C/EBP $\beta$  Preferentially Bind NF- $\kappa$ B p50 Compared with p65 Focusing Therapeutic Targeting on the C/EBP: p50. Interaction. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 1395-405.
- Dore M. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *Vet Pathol* 2011; 48(1): 254-65.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill, A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast. Cancer. Res*. 2000; 2: 252-257.
- Džodić R, Nešković Konstantinović Z, Gudurić B. Rak dojke. Beograd, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. 2014.

- Eckhardt S. Recent Progress in the Development of Anticancer Agents. *Curr Medi ChemAnti Canc Agents* 2002; 2: 419-439.
- Evan G, Littlewood T. A Matter of Life and Cell Death. *Science* 1998; 281(5381):1317-22.
- Felty Q, Singh KP, Roy D. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene*. 2005; 24(31): 4883–93.
- Filipović S, Filipović A, Stojiljković V, Mišić I, Vrbić S, Pejčić I, Stanojević Z. Breast Cancer - Clinical Implication. *JMB* 2007; 26: 134-143.
- Finnberg N, El-Deiry WS. TRAIL death receptors as tumor supresor and drug targets. *Cell Cycle* 2008; 7: 1525-28.
- Fionda C, Abruzzese MP, Santoni A, Cippitelli M. Immunoregulatory and Effector Activities of Nitric Oxide and Reactive Nitrogen Species in Cancer. *Curr. Med. Chem.* 2016; 23: 2618-2636.
- Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *Journal of Cell Science* 2012; 125: 4703-11.
- Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 433-438.
- Fogg VC, Lanning N J, MacKeigan P J. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer* 2011; 30(8):526-539.
- Fong PC, Xue WC, Ngan HYS, Chiu PM, Chan KYK, Tsao GSW, Cheung ANY: Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study. *J Clin Pathol* 2006, 59(2):179-183.
- Fosslien E. Review: Molecular Pathology of Cyclooxygenase-2 in Cancer-induced Angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31: 325-48.
- Fournier D, Gordon GB. COX-2 and Colon Cancer: Potential Targets for Chemorevention. *Journal of Cellular Biochemistry* 2000; 77: 97-102.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, Alan R. Liss, Inc New York, 1983.
- Freudenberg JA, Wang Q, Katsumata M, Drebin J, Nagatomo I, Greene MI. The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Exp Mol Pathol*. 2009; 87(1): 1–11.
- Friedl P и Wolf K. Plasticity of cell migation: A multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188: 11-19.
- Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 454-457.

- Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(6): 329 -344
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM: Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2000, 21: 2283-2294.
- Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 370835.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-376.
- Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJ. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer* 2006; 119: 2247–54.
- Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 2008; 15(7): 1113-1123.
- Gao L, Williams L. Nitric oxide-donating aspirin induces G2/M phase cell cycle arrest in human cancer cells by regulating phase transition proteins. *Int J Oncol* 2012; 41: 325-330.
- Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician* 2008; 77(3): 311-9.
- Go YM, Patel RP, Maland MC, et al. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Am J Physiol.* 1999; 277(4): H1647-H1653.
- Gomez-Monterrey I, Santelli G, Campiglia P, Califano D, Falasconi F, Pisano C, Vesci L, Lama T, Grieco P, Novellino E. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Novel Spirohydantoin Derivatives of the Dihydrothieno[2,3-b]naphtho-4,9-dione System. *J Med Chem* 2005; 48: 1152-1157.
- Gomha S, Abdelhamid A, Abdelrehem N, Kandeel S. Efficient Synthesis of New Benzofuran-based Thiazoles and Investigation of their Cytotoxic Activity Against Human Breast Carcinoma Cell Lines. *J Heterocyclic Chem* 2016; 55: 995–1001.
- Gomha S, Badreyb M, Edreesc M. Heterocyclisation of 2,5-diacetyl-3,4-disubstituted-thieno[2,3-b] thiophene bis-thiosemicarbazones leading to bis-thiazoles and bis-1,3,4-thiadiazoles as anti-breast cancer agents. *JChemRes* 2018; 40: 120–125.
- Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM, Grosser T, Altman RB, Klein TE. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2012; 22(4): 310-318.
- Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* 2018; 32(19-20): 1267–1284.
- Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1):25.

Granot Z, Fridlender ZG. Plasticity beyond Cancer Cells and the "Immunosuppressive Switch". *Cancer Res* 2015; 75: 4441-4445.

Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts RH, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE 2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377-386.

Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft* 1879; 12: 426-428.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.

Guerra AS, Malta DJ, Laranjeira LP, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. *Int Immunopharmacol.* 2011; 11(11): 1816-1822.

Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006; 127(4): 679-695.

Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(11): 1295–322.

Gurpinar E, William E. Grizzle W E, Gary A. Piazza G A. COX-independent mechanisms of cancer chemoprevention by anti-inflammatory drugs. *Front Oncol* 2013; 3: 1-18.

Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 2004; 9: 691-704.

Halasz M, Kholodenko BN, Kolch W, Santra T. Integrating networkreconstruction with mechanistic modeling to predict cancer therapies. *Sci Signal* 2016; 9: ra114.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford Univerity Press Inc. 2007.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford Univerity Press Inc. 1999

Halliwell B. Oxidation of low-density lipoprotein: questions of initiation, propagation and the effect of antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 670S-677S.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-674.

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29(Pt 2): 345-350.

Haraldsdottir S, Einarsdottir HM, Smaradottir A, Gunnlaugsson A, Halfdanarson TR. Colorectal cancer-review. *Laeknabladid* 2014; 100: 75-82.

Harris RE, Casto BC, Harris ZM. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5(4): 677-692.

Harris R, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Final results of a case control study. *Breast Cancer Screening and Prevention*. 2011; 3: 113-124.

Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., Mortezaee, K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J. Cell. Physiol.* 2019; 234, 5683-5699.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 150845.

Henderson BR, Fagotto F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 2002; 3: 834-839.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.

Herrera JA, Ward CS, Pitcher MR, Percy AK, Skinner S, Kaufmann WE, Glaze DG, wehrens XHT, Neul JL. Treatment of cardiac arrhythmias in a mouse model of Rett syndrome with Na<sup>+</sup>-channel-blocking antiepileptic drugs. *Dis Model Mech* 2015; 8: 363-71.

Herszényi L, Barabás L, Hritz I, István G, Tulassay Z. Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression. *World J Gastroenterol*. 2014;20(37):13246-13257.

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role fo L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987; 235: 437-476.

Higuchi M, Honda T, Proske R J, Yeh E TH. Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene* 1998; 17: 2753 -2760.

Hindley C, Philpott A. The cell cycle and pluripotency. *Biochem J* 2013; 451: 135-43.

Hinshaw DC, Shevde L A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. 2019; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962

Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2 – 10 Years Later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(2): 367-75.

Hippeli S, Elstner EF. Oxygen radicals and air pollution. In: Sies H, ed. *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants*. London: Academic Press. 1991; pp.3-56.

Hmuda S. Synthesis, structure and solvatochromism of 3-(4-substituted benzyl)-5-alkyl-5-phenilhydantoins as potentially pharmacologically active compounds. Doctoral dissertation, University of Belgrade, Belgrade 2014.

Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(23): 3853-3868.

Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Ikemura M, Yamashita F, Hashida M. SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25(5): 531-536

Hyoudou K, Nishikawa M, Kobayashi Y, Kuramoto M, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of adhesion and proliferation of peritoneally disseminated tumor cells catalase *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 269-278.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-88.

Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearson ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. *Science* 1997; 275: 1649–1652.

Ivanenkov YA, Veselov MS, Rezekin IG, Skvortsov DA, Sandulenko YB, Polyakova MV, Bezrukov DS, Vasilevsky SV, Kukushkin ME, Moiseeva AA. Synthesis, isomerization and biological activity of novel 2-selenohydantoin derivatives. *Bioorg Med Chem* 2016; 24: 802–811.

Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 2001; 477(1-2): 7-21.

Jaeschke H, Mitchell R, McGil M R, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 2012; 44(1): 88–106.

Jansen M, Potschka H, Brandt C, Löscher W, Dannhardt G. Hydantoin-substituted 4,6-dichloroindole-2-carboxylic acids as ligands with high affinity for the glycine binding site of the NMDA receptor. *J Med Chem*. 2003;46(1):64-73.

Jie L, Wuliji O, Wei L, Zhi-Gang J, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 24438-24475.

Jintao H, Hongbo D, Zhihong X, Jianping L, Mingan W. Facile Synthesis of 5-Arylidene Thiohydantoin by Sequential Sulfonylation/Desulfonation Reaction. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 12484-12495.

Johnson G L, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007; 8 (1773): 1341-1348

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 2002; 108(2) :153-64.

Jurna I, Brune K. Central effect of the non-steroid anti-inflammatory agents, indometacin, ibuprofen, and diclofenac, determined in C fibre-evoked activity in single neurones of the rat thalamus *Pain*. 1990; 41 (1): 71-80

- Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, et al. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res.* 2002;62(5):1567-1572.
- Kaluđerović G, Miljković Đ, Mimčilović M, Đinović V, Mostarica Stojković M, Sabo TJ, Trajković V. Novel platinum (IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int. J. Cancer* 2005; 116: 479–486.
- Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC. Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical-and peroxyxynitrite-mediated oxidation of thiols-a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band. *Anal Biochem* 1996; 241: 75-81.
- Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signal* 1999; 11:1-14.
- Kapitanović S, Čačev T, Radošević S, Spaventi Š, Spaventi R, Pavelić K. APC gene loss of heterozygosity, mutations, E1317Q, and I1307K germ-line variants in sporadic colon cancer in Croatia. *Experimental and Molecular Pathology* 2004; 77(3): 193-200.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.* 1995; 55(12): 2556-2559.
- Kasai H, Nishimura S. Formation of 8-hydroxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: Sies H, ed. *Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press. 1991. pp. 99-118.
- Katić V, Kutlešić Č, Stojanović D, Petrović S, Dimov D, Tasić D, Gligorijević J, Mihailović D, Živković V, Jovičić-Milentijević M. *Opšta patologija, udžbenik za studente medicine i stomatologije*, Prosveta, Niš, 1996.
- Kavitha, CV, Nambiar M, Ananda Kumar CS, Choudhary B, Muniyappa K, Rangappa KS, Raghavan SC. Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 348-363.
- Kern A, Taubert H, Scheele J, Rudroff C, Mothes H, Kappler M, Bartel F, Richter KK. Association of p53 mutations, microvessel density and neoangiogenesis in pairs of colorectal cancers and corresponding liver metastases. *Int J Oncol* 2002; 21: 243-249.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
- Kessenbrock K, Chih-Yang Wang, and Zena Werb. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol.* 2015; 44-46: 84-190.
- Khavari TA, Rinn J. Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle.* 2007; 6(23): 2928-2931.
- Kim BH, Kim CI, Chang HS, Choe MS, Jung HR, Kim DY, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in chronic inflammation associated with benign prostatic hyperplasia: is it related to apoptosis and angiogenesis of prostate cancer? *Korean J Urol* 2011; 52: 253-9.

Kim JY, Hwang YP, Kim DH, Han EH, Chung YC, Roh SH, et al. Inhibitory effect of the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on carrageenan-induced inflammation *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70 (4): 858-864

Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *IntImmunopharmacol*. 2001; 1:1421-1441.

Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, Nakano K, Mibu R, Tanaka M, Katano M. Increased Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Human Colorectal Carcinoma and its Correlation with Tumor Progression. *Anticancer Res* 2004; 24: 675-82.

Koki AT, Leahy KM, Harmon JM, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 and cancer, In: RE Harris, ed. *COX-2 Blockade in Cancer Prevention and Therapy*, Humana Press, Totowa, NJ, 2002; 185–203.

Krishnamachary B, Stasinopoulos I, Kakkad S, et al. Breast cancer cell cyclooxygenase-2 expression alters extracellular matrix structure and function and numbers of cancer associated fibroblasts. *Oncotarget*. 2017;8(11):17981-17994.

Krivokapić Z. Karcinom debelog creva – od prevencije preko karcinogeneze do metastaze. 1<sup>st</sup> ed. Beograd, Zavod za udžbenike, 2018. p. 37-53.

Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 Is Overexpressed in Human Cervical Cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(2): 429-34.

Kulmacz RJ. Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Lett* 1998; 430: 154-7.

Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*. 2008; 68(6): 1777-1785.

Kumar CSA, Prasad SB, Vinaya K, Chandrappa S, Thimmegowda NR, Ranganatha SR, Swarup S, Rangappa KS. Synthesis and anti-proliferative activity of substituted diazapiro hydantoins: A structure-activity relationship study. *Invest New Drugs* 2009; 27: 131-139.

Kumar CSA, Veeresh B, Ramesha KC, Raj CSA, Mahadevaiah KM, Prasad SBB. Synthesis and Evaluation of Novel Diazapiro Hydantoins as Potential Anticonvulsants. *Cent. Nerv. Syst. Agents. Med. Chem.* 2017; 17: 201-208.

Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996; 384: 644-648.

Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, et al. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem*. 1997; 272(7): 4323-4326.

Lavrik I, Golks A, Krammer PH: Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005, 118:265-267.



- Lee PC, Kibbe MR, Schuchert MJ, et al. Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells. *Microvasc Res.* 2000; 60(3): 269-280.
- Levenat S, Levačić M. Molekularna osnova raka dojke vezana uz gene BRCA1 i BRCA2: karakteristikei ciljana terapija. *Liječnički vjesnik* 2010; 132(1-2): 34-37.
- Li J, Yang Z, Li Y, Xia J, Li D, Li H, Ren M, Liao Y, Yu S, Chen Y, Yang Y, Zhang Y. Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. *Oncotarget* 2016; 7(28): 44763-44778.
- Liang Y, Chen H, Ji L, Du J, Xie X, Li X, and Lou Y. Talin 2 regulates breast cancer cell migration and invasion by apoptosis. *Oncol Lett* 2018; 16: 285-293.
- Lin A, Dibling B. The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell* 2002; 1:112–116.
- Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; 44: 479-96.
- Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res* 2005; 15, 36–42.
- Liu N, Lu M, Tian X, Han ZJ. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Physiol.* 2007; 211: 279–286.
- Liu B, Qu L, Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer. Cell. Int.* 2015; 15: 106.
- Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, Lei Y. Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *J Cancer*, 2017; 8: 1586-1597.
- Liu Q, Chan ST, Mahendran R. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 637-42.
- Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(Pt 1): 1-9.
- Lopes RB, Gangeswaran R, McNeish IA, Wang Y, Lemoine NR: Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer* 2007; 120(11):2344-2352.
- López-Lázaro, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 2007; 252: 1-8.
- Lu SC. Regulation of Glutathione Synthesis. *Molecular aspects of medicine* 2009; 30(1-2): 42–59.
- Lüchtenborg M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Wark PA, Brink M, Roemen GM, Lentjes MH, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van 't Veer P, van den Brandt PA. Meat and fish consumption, APC gene mutations and hMLH1 expression in colon and rectal cancer: a prospective cohort study. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 1041-1054.

- Lumachi F, Santeufemia DA, Basso SMM. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J Biol Chem* 2015; 6(3): 231-239.
- Majid AS, Majid AM, Yin ZQ, Ji D. Slow regulated release of H<sub>2</sub>S inhibits oxidative stress induced cell death by influencing certain key signaling molecules. *Neurochem Res.* 2013; 38(7):1375-1393.
- Majumder M, Xin X, Liu L, Tutunea-Fatan E, Rodriguez-Torres M, Vincent K, et al. COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis. *Stem Cells.* 2016; 34:2290-305.
- Marinova P, Marinov M, Kazakova M, Feodorova Y, Slavchev A, Blazheva D, Georgiev D, Penchev P, Safarina VS, Stoyanov NM. Study on the Synthesis, Characterization and Bioactivities of 3-Methyl-9'-fluorenespiro-5-hydantoin. *Acta ChimSlov* 2016; 63: 26-32.
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-70.
- Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG. *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective.* Austin (TX): Landes Bioscience;UK, 2013.
- Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
- Matić M M, Paunovic M G, Ognjanovic B I, Stajn Andras, Saicic S. Neuropeptide Y reduces migration capacity of human choriocarcinoma cell line by altering oxidative/antioxidative status. *Turk J Biol* 2017; 41(2): 292-301.
- Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 327: 43-87.
- Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 446-454.
- Mazhar D, Gillmore R, Waxman J. COX and cancer. *Q. J. Med.* 2005; 98:711-718.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1263-1284.
- Medan Dj, Wang L, Toledo D, Lu B, Stehlik C, Jiang B-H, Shi X, Rojanasakul Y. Regulation of Fas (CD95)- induced apoptotic and necrotic cell death by reactive oxygen species in macrophages. *Journal of cellular Physiology* 2005; 203(1):78-84.
- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D.C., Radisky, E.S., 2014. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 5, 2736-2749.
- Menon SG, Coleman MC, Walsh SA, Spitz DR, Goswami PC. Differential susceptibility of nonmalignant human breast epithelial cells and breast cancer cells to thiol antioxidant-induced G(1)-delay. *AntioxidRedox Signal* 2005; 7: 711-718.

Messmer UK, Reed UK, Brune B. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 20192-20197.

Miljuš D, Živković S, Božić Z. Incidencija i mortalitet raka u centralnoj Srbiji. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr. Milan Jovanović - Batut“, Beograd, 2017.

Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB: Expression of Bcl-XL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995, 86:1903-1910.

Miquel C, Borrini F, Grandjouan S, Aupérin A, Viguier J, Velasco V, Duvillard P, Praz F, Sabourin JC: Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *Am J Clin Pathol* 2005, 23(4): 562-570.

Moncada S, Higgs EA, Furchgott R. XIV international union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49(2): 137-142.

Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9(13): 1319-1330.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 2013; 39(1): 61-73.

Murad H, Hawat M, Ekhtiar A, AlJapawe A, Abbas A, Darwish H, Sbenati O, Ghannam A. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. *Cancer Cell Int* 2016; 16: 39.

Murakami Y, Kohsaka H, Kitasato H, Akahoshi T. Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2. *J Immunol*. 2007; 178(2): 1144-1150.

Nagendraprabhu P, Sudhandiran G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFκB and COX-2. *Invest New Drugs*. 2011;29(2):207-224.

Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol* 2013; 35(2): 123–137.

Naziroglu M. TRPV1 Channel: A Potential Drug Target for Treating Epilepsy. *Current Neuropharmacology* 2015, 13(2).

Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407(6805): 810-6.

- Nie D. Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers. *Front Biosci* 2007; 12: 1574-85.
- Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 61: 153-161.
- Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Op in Immunol* 2014; 27: 1-7.
- Nowarski R, Gagliani N, Huber S, and Flavell RA.. Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer. *Cancer Immunol Res* 2013; 1: 77-84.
- Nowsheen S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol* 2012; 34: 243-54.
- Obrađović A, Žižić J, Trišović N, Božić B, Ušćumlić G, Božić B, Marković S. Evaluation of anti-oxidative effects of twelve 3-substituted-5,5-diphenylhydantoin s on human colon cancer cell line HCT-116. *Turk J Biol* 2013; 37: 741-747.
- Ocvirk S, O'Keefe SJD. Influence of Bile Acids on Colorectal Cancer Risk: Potential Mechanisms Mediated by Diet - Gut Microbiota Interactions. *Curr Nutr Rep* 2017; 6(4): 315-322.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53 AIP1, a Potential Mediator of p53-dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000; 102: 849-62.
- Ognjanović BI, Pavlović SZ, Maletić SD, Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Radojičić RM, Petrović VM. Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. *Physiol Res* 2003; 52: 563-570.
- Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 592-603.
- Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2844-60.
- Opačić N, Barbarić M, Zorc B, Cetina M, Nagl A, Frković D, Kralj M, Pavelić K, Balzarini J, Andrei G, Snoeck R, Clerc ED, Raić-Malić S, Mintas M. The Novel L- and D-Amino Acid Derivatives of Hydroxyurea and Hydantoin s: Synthesis, X-ray Crystal Structure Study, and Cytostatic and Antiviral Activity Evaluations. *J Med Chem* 2005; 48: 475-482.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007; 96(9): 2181-96.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315-424.

- Pang L Y, Hurst E A, Argyle D J. Cyclooxygenase-2: A Role in Cancer Stem Cell Survival and Repopulation of Cancer Cells during Therapy. 2016; <https://doi.org/10.1155/2016/2048731>
- Park J. Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages. *Exp Mol Med* 2003; 35: 325-335.
- Parkash J, Felty Q, Roy D. Estrogen exerts a spatial and temporal influence on reactive oxygen species generation that precedes calcium uptake in high-capacity mitochondria: implications for rapid nongenomic signaling of cell growth. *Biochemistry* 2006; 45: 2872–2881
- Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem*. 2001; 47(8):1467-1469.
- Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Update*. 2004; 7: 97-110.
- Pérez-Sala D, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(2), 231-48.
- Petrović M, Todorović D. Apoptosis and cell cycle. *Medart*, 2014; 6: 21-32.
- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer. Biol*. 2004; 14: 433-439.
- Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of 10 hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38(1-2): 161–170.
- Pompella A, Visvikisa A, Paolicchi A, Vincenzo DT, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Bioch Pharma* 2003; 66: 1499-1503.
- Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011; 60: 116-29.
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R: Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995, 55:4438.
- Rajić Z, Zorc B, Raic Malic S, Ester K, Kralj M, Pavelic K, Balazirini J, Clercq ED, Mintas M. Hydantoin Derivatives of L- and D-amino acids: Synthesis and Evaluation of Their Antiviral and Antitumoral Activity. *Molecules* 2006; 11: 837-848.
- Ramsey M, Sharpless, N. ROS as a tumour suppressor? *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1213–1215.
- Rayburn ER, Ezell SJ, Zhang R. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol*. 2009; 1(1): 29-43.
- Reddy KB, Glaros S. Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2007;30(4):971-975.

- Regulski M, Regulska K, Prukała W, Piotrowska H, Stanisz B, Murias M. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. *Drug. Discov. Today*. 2016; 21: 598-615.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(5): 986-1000.
- Rigas B, Williams JL. NO-donating NSAIDs and cancer: an overview with a note on whether NO is required for their action. *Nitric Oxide* 2008; 19: 199-204.
- Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H and Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 632-635.
- Roberts P J, Der C J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26(22): 3291-310.
- Roberts W, Riba R, Homer-Vanniasinkam S, Farndale RW, Naseem KM. Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6: 2175-2185.
- Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases as Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 5287-5297.
- Ruddon R . *Cancer Biology*. 4<sup>th</sup> ed. New York, Oxford University Press, 2007.
- Ruiz-Ramos R, Lopez-Carrillo L, Rios-Perez AD, De Vizcaya-Ruiz A, Cebrian ME. Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat Res.* 2009;674(1-2):109-115.
- Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Current Opinion in Genetics Development* 2005; 15(1): 87-96.
- Said, A.H., Raufman, J.P., Xie, G. The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2014; 6, 366-375.
- Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature Immunol* 2008; 9:949-952.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-1212.
- Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H. Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 1999;448(2-3):301-303.
- Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925.
- Schneider MTY, Sweeney CJ, Jung SH, Crowell PL, Marshall MS. Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298(3):976-85.

Scholl S, Koch A, Henning D, Kempter G, Kleinpeter E. The influence of Structure and Lipophilicity of Hydantoin Derivatives on Anticonvulsant Activity. *Structural Chemistry* 1999, 10: 355-366.

Sekulić Djaković TLj, Smoliński A, Trišović NP, Ušćumlić GS, Božić BDj. Chemometric Study of the Antiproliferative Activity of Some New Hydantoin Derivatives: Assessment of Activity and Chromatographic Lipophilicity Data. *J Braz Chem Soc* 2015; 26: 1379-1386.

Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 2012; 48(2): 158–167.

Shacka J J, Sahawneh, M A, Gonzalez, J D, Ye, Y-Z, D'Alessandro T L, Estévez A G. Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Death Differ* 2006;13(9):1506-14.

Shao J, Jung C, Liu C, Sheng H. Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *J Biol Chem* 2005;280(28):26565-26572.

Shen XG, Wang C, Li Y, Wang L, Zhou B, Xu B, Jiang X, Zhou ZG, Sun XF: Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Dis* 2010; 12(12):1213-1218.

Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163: 5211-5218.

Shin SW, Seo CY, Han H, Han JY, Jeong JS, Kwak JY, Park JI. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (17):5414–5425.

Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, Watanabe K, Kawamori T, Maruyama T, Sugimoto Y, Negishi M, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* 2004; 53: 1151–8.

Shounan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998; 217: 61-70.

Shukla S, Dass J, Pujani M. p53 and bcl2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papilloma virus 16 and 18. *South Asian J Cancer*. 2014; 3:48-53.

Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 104-117.

Sies H. Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants. London: Academic Press, 1991

Singh-Ranger G, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 729-37.

- Šipetić Grujičić S, Nikolić A, Pislar A, Pavlović A, Banašević M, Maksimović J, Krivokapić Z. Umiranje usled kolorektalnog raka u Centralnoj Srbiji u periodu 1999-2014 „Joinoint“ regresiona analiza. *Zdravstvena zaštita* 2019; 48(3): 33-42.
- Smith WL, Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxidase Hsynthases 1- and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69:115-128.
- Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res.* 2009; 50 Suppl(Suppl): S423-S428.
- Snyder CM, Shroff EH, Liu J, Chandel NS. Nitric Oxide Induces Cell Death by Regulating Anti-Apoptotic BCL-2 Family Members. *PLoS ONE* 2009; 4(9): e7059.
- Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 215158.
- Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS. Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2007: str. 1–449.
- Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia.* 2008;22(4):686-707. doi:10.1038/leu.2008.26
- Steven J. Forrester, Daniel S. Kikuchi, Marina S. Hernandez, Qian Xu, Kathy K. Griendling. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research* 2018; 122: 877-902.
- Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005; 10:1881–96
- Subbaramaiah K, Marmo TP, Dixon DA and Dannenberg AJ. Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes. Evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2 and HuR. *J Biol Chem* 2003; 278: 37637-37647.
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer. Evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 2002; 277: 18649-18657.
- Sudo R.T., J.A. Calasans-Maia, S.L. Galdino, M.C. Lima, G. Zapata-Sudo, M.Z. Hernandez, Pitta R I. Interaction of morphine with a new alpha2-adrenoceptor agonist in mice *J Pain*, 2010; 11(1): 71-78.
- Sung S, Park Y, Jo JR, Jung NK, Song DK, Bae J, Keum DY et al. Over expression of cyclooxygenase-2 in NCI-H292 human alveolar epithelial carcinoma cells: Roles of p38 MAPK, ERK-1/2, and PI3K/PKB signaling proteins. *J Cell Biochem* 2011; 112 (10): 3015–24.
- Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991; 51(3):794–8.



Taguchi A, Kawana K, Tomio K, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2014; 9(2): e89605.

Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A2 and apoptosis. *BiochimBiophys Acta* 2002; 1585: 72-6.

Takkouche B, Regueira-Méndez C, Etminan M. Breast Cancer and Use of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: A Meta-analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 100, Issue 20, 15 October 2008; 100(20): 1439–1447.

Tanaka A, Hase S, Miyazawa Drug-Induced Intestinal Damage in Rats: relation to Various athogenic Events. *JPET* 2002; 303: 1248-1254.

Tao Z, Gomha S, Badrey M, El-Idreesy T, Eldebss T. Novel 4-Heteroaryl-antipyridines: Synthesis, Molecular Docking, and Evaluation as Potential Anti-breast Cancer Agents. *J Heterocyclic Chem* 2018; 55: 2408–2416.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231-41.

Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 17279-303.

Thenmozhiyal J C, Wong P T-H, Chui W-K. Anticonvulsant activity of phenylmethylenhydantoins: a structure-activity relationship study. *J Med Chem* 2004; 47(6): 1527-153.

Tołoczko-Iwaniuk N, Dziemiańczyk-Pakiela D, Nowaszewska BK, Celińska-Janowicz K, Milyk W. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention - Review. *Curr Drug Targets*. 2019; 20: 302-315.

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 579-91.

Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:972913.

Trepac X, Chen Z, Jacobson K. Cell Migration. *Compr Physiol* 2012; 2(4): 2369-92.

Triner D, Shah Y M. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest*. 2016; 126(10): 3689-3698.

Trišović N, Božić B, Obradović A, Stefanović O, Marković S, Čomić Lj, Božić B, Ušćumlić G. Structure-activity relationships of 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins as potential antiproliferative and antimicrobial agents. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2011; 76: 1597-1606.

- Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells [published correction appears in *Cell* 1998;94(2):273]. *Cell*. 1998;93(5):705-716.
- Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Statist Med* 2004; 23:1111–1130.
- Tyrrell RM. UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In: Sies H, ed. *Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press 1991; pp.57-84.
- Umar A, Steele VE, Menter DG, Hawk ET. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention. *Semin Oncol*. 2016; 43(1): 65-77.
- Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy. *Cancer Lett* 2008; 266(1): 37-52.
- Vahora, H., Khan, M.A., Alalami, U., Hussain, A., The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. *J. Cancer. Prev.* 2016; 21: 1-12.
- Vamecq J, Bac P, Herrenknecht C, Maurois P, Delcourt P, Stables JP. Synthesis and anticonvulsant and neurotoxic properties of substituted N-phenyl derivatives of the phthalimide pharmacophore. *J Med Chem* 2000; 43: 1311-9.
- Vandoros GP, Konstantinopoulos PA, Sotiropoulou-Bonikou G, et al. PPAR-gamma is expressed and NF-kB pathway is activated and correlates positively with COX-2 expression in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006; 132(2): 76-84.
- Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*. 2015; 6:334-343.
- Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Reactive Oxygen Species Produced by NAD(P)H Oxidase Inhibit Apoptosis in Pancreatic Cancer Cell. *J Biol Chem* 2004; 279: 34643-34654.
- Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cell and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine* 2012; 7(4): 597-615.
- Wang D, Xia D, Dubois RN. The Crosstalk of PTGS2 and EGF Signaling Pathways in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2011; 3(4): 3894-908.
- Wang D, DuBois RN. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*. 2015; 36(10): 1085-1093.
- Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*, 2006; 5:14.
- Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 2017 May; 9(5): 52.

Wei Y, Fan T, Yu M: Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008, 40(4):278-288.

Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2<sup>nd</sup> ed., Garland Science, New York and London, 2014.

Weinberg JB. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. *Immunol Res*, 2000, 22(2-3), 319-41.

Wiese FM, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX 1 and COX 2. *Carcinogenesis* 2001; 22: 5-10.

Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 87.

Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(4):695-705.

Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res*. 2011; 10(4): 655–683.

Zawia NH, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F. Epigenetics, oxidative stress and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(9): 1241-1249.

Zha C, Brown GB, Brouillette WJ. Synthesis and Structure– Activity Relationship Studies for Hydantoins and Analogues as Voltage-Gated Sodium Channel Ligands. *J. Med. Chem*. 2004; 47(26): 6519–6528.

Zhang H, Wong CCL, Wei H, Korangath P, Chaturvedi P, Schito L, Chen J, Krishnamachary B, Winnard PT Jr, Raman V, Zhen L, Mitzner WA, Sukumar S, Semenza GL. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene*. 2012; 31(14): 1757-1770.

Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res*. 2007;100(7):1089-1098.

Zheng S, Yumei F, Chen A. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(3):444-453.

Zuliani V, Carmi C, Rivara M, Fantini M, Lodola A, Vacondio F, Bordi F, Plazzi PV, Cavazzoni A, Galetti M, Alfieri RR, Petronini PG, Mor M. 5-Benzylidene-hydantoins: synthesis and antiproliferative activity on A549 lung cancer cell line. *Eur J Med Chem* 2009; 44: 3471-9.

Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, 2000.

## Биографија

Ана Д. Обрадовић рођена је 14.09.1981. године у Крагујевцу, Република Србија. Основну школу завршила је у Крагујевцу. Другу крагујевачку гимназију је завршила 2000. године. Школске 2000/2001 године уписала је Природно-математички факултет у Крагујевцу, смер Биологија где је дипломирала 2007. године са оценом 10 на дипломском раду. Школске 2009/2010 уписала је Академске специјалистичке студије на Биолошком факултету у Београду на модулу Имунобиологија са микробиологијом. Академске специјалистичке студије је завршила 2012. године. Докторске академске студије уписала је 2011/2012 године на Биолошком факултету, Универзитета у Београду смер Имунобиологија.

Од септембра 2008. године запослена је на Природно-математичком факултету, као истраживач приправник. Од 2008. године је радила на европском пројекту, Седми оквирни програм, ФП7, а од 2011. године учествује у раду пројеката Министарства науке и технолошког развоја као истраживач сарадник.

Број публикованих радова у међународним научним часописима је 15, од тога су два рада из докторске дисертације и два из области истраживања.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Обрадовић

број индекса Б3036/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларни механизми антитуморске активности новосинтетисаних  
3-супституисаних-5-изопропил-5-фенилхидантоина

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 12.07.2020.

Ана Обрадовић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_Ана Обрадовић\_\_

Број индекса \_\_\_\_Б3036/2011\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_Биологија\_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_Молекуларни механизми антитуморске активности  
новосинтетисаних 3-супституисаних-5-изопропил-5-фенилхидантоина\_\_

Ментор \_\_\_\_\_проф.др Биљана Божић Недељковић\_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_Ана Обрадовић\_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 12.07.2020.

Потпис докторанда

Ана Обрадовић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларни механизми антитуморске активности новосинтетисаних  
3-супституисаних-5-изопропил-5-фенилхидантоина  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
- 5. Ауторство – без прераде**
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 12.07.2020.

Потпис докторанда

Ана Обрадовић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.



## RESEARCH ARTICLE

# Anti-Tumor Mechanisms of Novel 3-(4-Substituted Benzyl)-5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin Derivatives in Human Colon Cancer Cell Line

Ana Obradović<sup>a</sup>, Miloš Matić<sup>a</sup>, Branka Ognjanović<sup>a</sup>, Nenad Vuković<sup>b</sup>, Milena Vukić<sup>b</sup>, Predrag Đurđević<sup>c</sup>, Gordana Ušćumlić<sup>d</sup>, Bojan Božić<sup>e</sup> and Biljana Božić Nedeljković<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology and Ecology; Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>c</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>d</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia; <sup>e</sup>Institute of Physiology and Biochemistry „Ivan Đaja“; Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

**Abstract: Background:** Hydantoin and its newly synthesized derivatives have recently become a focus of interest due to their numerous biological activities and newly emerging beneficial effects in different pathological conditions, including cancer.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the possible anti-tumor mechanisms of a series of newly synthesized 3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives in different aspects of cell physiology of human colon cancer cell line, HCT-116.

**Method:** The increasing concentrations of derivatives (0.01 μM up to 100 μM) were applied to cells during 24 h, 48 h, and 72 h after which the evaluation of proliferation, apoptosis, oxidative/anti-oxidative status, nitrite production, and migration/invasion potential of treated cells was performed.

**Results:** All tested compounds expressed the dose- and time-dependent anti-proliferative and pro-apoptotic activities against HCT-116 cells. The investigated derivatives induced a decrease in levels of oxidative stress parameters and an increase in levels of nitrite production by treated cells suggesting their significant anti-oxidative effects. The cell migration index and expression level of tumor invasion-promoting metalloproteinase-9 (MMP-9) gene were significantly decreased after treatment with the tested hydantoin derivatives implicating their inhibitory role in colon cancer cell motility and invasion processes. The mRNA level of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene as a pro-inflammatory gene related to colorectal carcinogenesis was reduced compared to values in the non-treated control cells indicating the significant anti-inflammatory/anti-tumor effects of these compounds.

**Conclusion:** The obtained results show the significant anti-tumor potential of tested derivatives, especially 3-benzyl-5-isopropyl-5-phenylhydantoin and 3-(4-chlorobenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin, suggesting their potential usage in the development of more effective chemotherapies.

**Keywords:** Hydantoin derivatives, colon cancer cell line, apoptosis, antioxidants, nitric oxide, cell migration.

## ARTICLE HISTORY

Received: November 04, 2018  
Revised: March 19, 2019  
Accepted: April 11, 2019

DOI:  
10.2174/1871520619666190425180610

## 1. INTRODUCTION

Hydantoin (imidazolidine-2,4-dione) and its numerous derivatives are compounds widely used for clinical treatment of seizures, epilepsy, and cardiac arrhythmias [1, 2]. Possessing various biological and pharmacological properties, hydantoin derivatives gained additional applications as anti-microbial, fungicidal, and herbicidal agents, also expressing significant anti-inflammatory, hypolipidemic, anti-hypertensive, and anti-tumor activities [3-5]. Novel physiological roles of hydantoin and its derivatives emerged in numerous studies are yet to be fully understood.

Colorectal cancer is one of the three most common cancer types in the Western Hemisphere and represents a leading cause of death

induced by cancer overall [6]. Up to 20% of patients experience metastatic dissemination, most commonly to the liver. The surgery could be an effective treatment only for selected patients, while the radiation and adjuvant chemotherapy remain the dominant recommended therapies for colorectal cancer patients with lymph node metastases [7].

The considerable cytotoxicity of common non-specific chemotherapy medications has limited their applications and since most of the human malignant tumors turn out to be drug-resistant, establishing the therapy with less toxic and more selective anti-tumor compounds is essential. Various studies have reported significant cytotoxic activities of hydantoin derivatives in different cancer cell types: spirohydantoin derivatives display anti-proliferative effects in ovarian and breast cancer cells and induce growth inhibition and apoptosis of leukemic cells [8, 9]. Literature data indicate that 5-benzylidene-hydantoin, as bioisosteres of 4-anilinoquinazolines inhibit expression level of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and are already approved for the treatment of lung cancer

\*Address correspondence to this author at the Institute of Physiology and Biochemistry „Ivan Đaja“; Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia; Tel/Fax: +381 11 303 2356; E-mails: [biljana@bio.bg.ac.rs](mailto:biljana@bio.bg.ac.rs), [najbiljana@yahoo.com](mailto:najbiljana@yahoo.com)

[10, 11]. Hydantoin derivatives with substituted cycloalkyl, phenyl, and benzhydryl groups have been shown to express the strongest anti-tumor effects [12].

The production of reactive oxygen species (ROS) is a physiological process inherent to all aerobic organisms due to mitochondrial respiratory chain activity [13]. Oxidative stress represents an imbalance between the production of these aggressive radicals and their neutralization by the compensating anti-oxidative mechanisms, which can lead to multiple cellular damages and to development of various diseases, including cancer [14-16]. ROS induce carcinogenesis by genetic and epigenetic mechanisms and elevated levels of ROS detected in numerous tumors strongly implicate the role of DNA damage by different oxidizing molecules in promoting tumor development and progression [17]. Literature data suggest the presence of elevated levels of reactive radical compounds and attenuated efficiency of the anti-oxidative defense system in cancer cells [18].

In experiments with different cancer cell lines, the positive correlation between high levels of endogenous oxidative stress and increased proliferation of malignant cells has been observed, while the application of anti-oxidative molecules reduces or inhibits proliferation of these cells [17, 19].

The role of hydantoin derivatives synthesized and tested in the present study as potential anti-tumor compounds can be further elucidated considering the results obtained in our previous study, where a series of hydantoin compounds expressed anti-proliferative and anti-oxidative activity in tumor HCT-116 cell line [20, 21]. Chemotactic migration and invasion of cancer cells into the surrounding tissue is a crucial step in tumor metastasis and many therapeutic approaches are based on a reduction of migration/invasion capacity of cancer cells [22]. Being one of the most severe health concerns of the modern age, improvement of colorectal cancer treatments is in the focus of many recent studies. The significant anti-tumor activities of hydantoin derivatives make these compounds important experimental drugs in the development of contemporary cancer therapies. The aim of this research was to evaluate the effects of a series of newly synthesized 3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives on proliferation index, apoptosis levels, oxidative/anti-oxidative balance, nitrite production, and migration/invasion potential of human colon cancer cell line, HCT-116.

## 2. MATERIALS AND METHOD

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA and PBS were obtained from GIBCO, Invitrogen, USA. Nitro blue tetrazolium (NBT) and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) were obtained from SERVA, Germany. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodium nitrite, phosphoric acid, sulfanilamide, sulfanilic acid, sulfosalicylic acid, and 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) from SIGMA-ALDRICH, USA. RNAlater solutions for RNA stabilization and storage and TRIZOL reagent are from Invitrogen, USA. Annexin-V-FITC, Apoptosis Detection Kit, Beckman Coulter, USA. All other chemical reagents were obtained commercially from Fluka (Germany), Fischer (USA) and Merck (Germany) and used without any further purification. All solvents and chemicals were of analytical grade.

### 2.1. Preparation of Drug Solutions

Stock solutions of the compounds were made in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the concentration of 1 M and diluted with DMEM to prepare various working solutions for cell treatment. The concentration of DMSO in the most concentrated treatment solution was below 0.5% (v/v) [21].

## 2.2. Synthetic Pathway

### 2.2.1. General Procedure for The Preparation Of 5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin

Following the method of Bucherer and Lieb [23] the appropriate ketone (0.2 mol) was dissolved in 50% ethanol (600 ml) and ammonium carbonate (57.6 g, 0.60 mol) and potassium cyanide (19.5 g, 0.30 mol) were then added (Fig. 1). This mixture was warmed under a condenser at a temperature of 60 °C for 15 h, after which the solution was concentrated to approximately two-thirds of the initial volume, chilled in an ice-bath and filtered. The product was dissolved in 5% sodium hydroxide solution, filtered from the unreacted ketone and re-precipitated by acidification with hydrochloric acid. Recrystallization from 60% ethanol yielded a crystalline product. The procedure for preparation of 3-benzyl-5,5-diphenylhydantoin (compound 0) has been described by Trišović and coworkers [20].

### 2.2.2. General Procedure For The Preparation Of 3-(4-Substituted Benzyl)-5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin

5-Isopropyl-5-phenylhydantoin (2.18 g, 0.010 mol) was dissolved in 60 ml of dimethylformamide (DMF) and potassium carbonate (6 g, 0.061 mol) was added. The reaction was stirred more than one hour, 4'-substituted benzylhalide (0.011 mol) was then added and the reaction was stirred over two days at room temperature. The reaction mixture was poured into three volumes of water and extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were washed with 5% sodium hydroxide solution, water, and then dried over magnesium sulfate. The solvent was removed, and the resulting solid was recrystallized from ethanol (Fig. 2).

#### 2.2.2.1. 5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

White crystalline solid; m.p.: 209-211 °C (lit. m.p.: 210-112<sup>179</sup>); yield: 80%; IR (KBr, ν / cm<sup>-1</sup>): 3286 (NH), 3216 (NH), 1749 (C=O), 1716 (C=O); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ / ppm): 10.77 [s, 1H, N(3)H], 8.75 [s, 1H, N(1)H], 7.55-7.28 [m, 5H, Ph], 2.53-2.40 [m, 1H, CH], 0.89 [d, J = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>], 0.62 [d, J = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>]; <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ / ppm): 176.7 (C4), 157.3 (C2), 138.9, 128.7, 128.0, 125.8, 71.6 (C5), 35.4, 16.9, 16.5.

#### 2.2.2.2. 3-(4-Methoxybenzyl)-5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (1)

Elemental analysis: calcd: C 70.99, H 6.55, N 8.28, found C 70.97, H 6.51, N 8.29. White crystalline solid; m.p.: 147-150 °C;

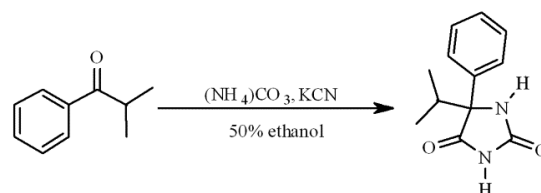


Fig. (1). Synthesis of 5-isopropyl-5-phenylhydantoin.

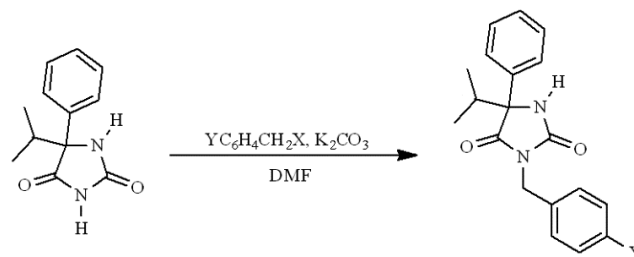


Fig. (2). Synthesis of 3-(4-substitutedbenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin (Y: CH<sub>3</sub> O (1), CH<sub>3</sub> (2), H (3), Cl (4), Br (5), CN (6), NO<sub>2</sub> (7)).

yield: 14%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3311 (NH), 1766 (C=O), 1707 (C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 9.11 [s, 1H, N(1)H], 7.56-7.35 [m, 5H, Ph], 7.34-6.82 [m, 4H,  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$ ], 4.43 [s, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 3.69 [s, 3H,  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$ ], 3.35 [s, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.73 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.61 [d, J = 8 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.4 (C4), 158.6 (C10), 156.3 (C2), 138.3 (C1'), 129.2 (C8 and C12), 128.6 (C7), 128.5 (C2'), 127.9 (C3' and C5'), 125.5 (C4' and C6'), 113.9 (C9 and C11), 70.3 (C5), 55.1, (C6), 35.6 (C1''), 16.6, 16.4 (C2'' and C3'').

### 2.2.2.3. 3-(4-Methylbenzyl)-5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (2)

Elemental analysis: calcd: C 74.51, H 6.88, N 8.69, found C 74.52, H 6.88, N 8.68. White crystalline solid; m.p.: 157-160 °C; yield: 34%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3229 (NH), 1770 (C=O), 1707 (C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 9.13 [s, 1H, N(1)H], 7.24-7.52 [m, 5H, Ph], 7.20-6.97 [m, 4H,  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ ], 4.45-4.35 [m, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 3.35 [m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 2.23-2.21 [m, 3H,  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$ ], 0.75 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ]; 0.62 [d, J = 8 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.4 (C4), 156.3 (C2), 138.3 (C1'), 136.7 (C10), 133.6 (C7), 129.0 (C9 and C11), 128.5 (C2' and C6'), 127.9 (C8 and C12), 127.6 (C3' and C5'), 125.6 (C4'), 70.3 (C5), 40.1 (C6) 20.8 (CH<sub>3</sub>-C10), 35.5 (C1''), 16.7, 16.5 (C2'' and C3'').

### 2.2.2.4. 3-Benzyl-5-isopropyl-5-phenylhydantoin (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (3)

Elemental analysis: calcd: C 74.00, H 6.54, N 9.08, found C 74.02, H 6.54, N 9.08. White crystalline solid; m.p.: 98-100 °C; yield: 24%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3297 (NH), 1766(C=O), 1702(C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 8.7 [s, 1H, N(1)H], 7.12-6.69 [m, 10H, 2 Ph], 4.06 [m, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 2.53-2.47 [m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.30 [d, J = 8 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.17 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.5 (C4), 156.3 (C2), 138.2 (C1'), 135.5 (C7), 128.5(C8 and C12), 127.5 (C2' and C6'), 127.7 (C3' and C5'), 127.5 (C10), 126.9 (C9 and C11), 125.6 (C4'), 74.3 (C5), 43.9 (C6), 35.5 (C1''), 16.6, 16.5 (C2'' and C3'').

### 2.2.2.5. 3-(4-Chlorobenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl) (4)

Elemental analysis: calcd: C 66.57, H 5.59, N 8.17, found C 66.57, H 5.60, N 8.17. White crystalline solid; m.p.: 140-145 °C; yield: 43%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3309 (NH), 1764 (C=O), 1710 (C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 9.18 [s, 1H, N(H)], 7.56-7.21 [m, 9H, 2Ph], 4.50 [s, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 3.49 [s, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.73 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.62 [d, J = 8 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.4 (C4), 156.1 (C2), 138.1 (C1'), 135.6 (C7), 132.2 (C10), 129.9 (C8 and C12), 129.6 (C9 and C11), 128.5 (C4'), 127.9 (C3' and C5'), 125.5 (C2' and C6'), 70.4 (C5), 40.1 (C6) 35.5 (C1''), 16.6, 16.4 (C2'' and C3'').

### 2.2.2.6. 3-(4-Bromobenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br) (5)

Elemental analysis: calcd: C 58.93, H 4.95, N 7.23, found C 58.92, H 4.95, N 7.23. White crystalline solid; m.p.: 146-150 °C; yield: 47%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3307 (NH), 1764 (C=O), 1709 (C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 9.18 [s, 1H, N(1)H], 7.54-6.96 [m, 9H, 2Ph], 4.68-4.16 [m, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 3.52-2.92 [m, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.74 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.62 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.6 (C4), 156.2 (C2), 138.2 (C1'), 136.1 (C7), 135.4 (C9 and C11), 131.6 (C8 and C12), 131.1 (C2' and C6'), 128.7 (C3' and C5'), 128.1 (C4'), 125.1(C10), 70.5 (C5), 40.5 (C6) 35.6 (C1''), 16.8, 16.6 (C2'' and C3'').

### 2.2.2.7. 3-(4-Cyanobenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (6)

Elemental analysis: calcd: C 72.05, H 5.74, N 12.60, found C 72.06, H 5.74, N 12.61. White crystalline solid; m.p.: 164-169 °C; yield: 40.90%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296 (NH), 1760 (C=O), 1707 (C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 9.23 [s, 1H, N(1)H], 7.85-7.29 [m, 9H, 2Ph], 4.44-4.83 [m, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 3.34 [s, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.77 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 0.64 [d, J = 6 Hz, 3H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.5 (C4), 156.0 (C2), 142.1 (C1'), 138.0 (C7), 132.6 (C9 and C11), 131.9 (C2' and C6'), 128.5 (C3' and C5'), 128.0 (C8 and C12), 125.5 (C4'), 118.6 (CN), 110.5 (C10), 70.5 (C5), 40.5 (C6) 35.6 (C1''), 16.7, 16.4 (C2'' and C3'').

### 2.2.2.8. 3-(4-Nitrobenzyl)-5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) (7)

Elemental analysis: calcd: C 64.58, H 5.42, N 11.89, found C 64.57, H 5.42, N 11.89. Yellow crystalline solid; m.p.: 102-105 °C; yield: 26%; IR (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ): 3307 (NH), 1766 (C=O), 1708 (C=O);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 9.21 [s, 1H, N(1)H], 8.22-8.17 [m, 4H,  $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ ], 7.54-7.29 [m, 5H, Ph], 4.68 [s, 2H, N- $\text{CH}_2-$ ], 3.36 [s, 1H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ], 1.23-0.62 [m, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ];  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  / ppm): 174.5 (C4), 155.0 (C2), 147. (C1'), 144.2 (C10), 138.6 (C7), 128.7 (C2' and C6'), 128.6 (C8 and C12), 128.0 (C3' and C5'), 125.4 (C4'), 123.8 (C9 and C11), 66.8 (C5), 25.6 (C6) 22.0 (C1''), 13.9 (C2'' and C3'').

## 2.3. Chemical Analysis of Newly Synthesized Derivatives

Elemental microanalyses for C, H, and N were performed by the standard methods on a Vario EL III C, H, N Elemental Analyzer. The melting points were determined in capillary tubes using melting point system Stuart SMP30.

The FT-IR spectra were obtained using a Bomem MB-Series 100 Fourier Transformation-infrared (FT-IR) spectrophotometer in the form of KBr pellets.

The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra were taken on a Varian Gemini 2000 (200 Hz and 50 Hz, respectively) in deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- $d_6$ ) with tetramethylsilane as an internal standard, at room temperature (25 °C).

The results of all chemical analysis and structures of synthesized 3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoins are presented in Supplementary Figs. S1-S29.

## 2.4. Cell Culture

The human lung normal fibroblast cell line, MRC-5, and human colon cancer cell line, HCT-116, were obtained from American Tissue Culture Collection. These cells were propagated and maintained in DMEM and supplemented with 10% FBS and combination of antibiotics (100 IU/mL-1 penicillin and 100  $\mu\text{g}$ mL-1 streptomycin). The cells were grown in 75  $\text{cm}^2$  culture flask and supplied with 15 mL DMEM at confluence of 70% to 80%. The cells were seeded in 96-well microplate (10 000 cells per well) and cultured in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C. After 24 h of cell incubation, 100  $\mu\text{L}$  of medium containing various doses of the investigated compounds (0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , and 100  $\mu\text{M}$ ) was added in each well of microplate and the cells were incubated for 24 h, 48 h, and 72 h. Non-treated cells were used as control. All treatment concentrations are obtained by serial dilutions of stock solution, so DMSO concentrations decreased continuously. For this study, the maximal final 0.00005% (v/v) DMSO concentration in culture has been tested on cytotoxicity and all other examined parameters and there was no statistically significant influence to treated cells compared to untreated (DMSO free)

control cells. Accordingly, in this investigation, untreated control cells were used as referent value in relation to which all further comparisons were made. Therefore, properties of all treated cells were compared with properties of DMSO free control cells. Absorbance was measured with an ELISA (2100C) 96-well plate reader (Rayto, China). All experiments (three independent) were done in triplicate.

### 2.5. Determination of Cell Proliferation (MTT Assay)

After all time intervals of treatment, the cell proliferation was determined by MTT assay [24]. At the end of the treatment period, 25  $\mu\text{L}$  of MTT solution (5  $\text{mg mL}^{-1}$  final concentration in PBS) was added to each well and incubated at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  for 3h. The produced formazan was dissolved by overnight incubation in SDS-HCl (10% SDS in 0.01 M HCl) and the percentage of viable cells was calculated as the ratio between the absorbance at each dose of the compounds and the absorbance of the non-treated control multiplied by 100 to get a percentage. We also calculated the half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ), defined as the concentration of test hydantoin derivatives that inhibited cell growth by 50% compared with a growth of non-treated control cells. The  $\text{IC}_{50}$  values were calculated from the dose curves by the software CalcuSyn.

### 2.6. Determination of Apoptosis by flow cytometry (Annexin V-FITC/7-AAD)

Annexin V-FITC is a fluorescent probe which binds to phosphatidylserine. At the onset of apoptosis, phosphatidylserine, normally found on the internal part of the plasma membrane, is translocated to the external layer of the membrane and becomes available to bind to the Annexin-V-FITC. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) binds to the cellular DNA in cells where the cell membrane has been totally compromised [25]. Apoptotic cells were detected using the Annexin-V-fluorescein isothiocyanate. Briefly, after treatment with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ , the cells were collected, washed in PBS and resuspended in ice cold binding buffer. Annexin-V-FITC and 7-AAD were added to each sample and incubated in the dark for 15 min. Ten thousand events were analyzed on FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer (Nyon, Switzerland). The percent of viable (Annexin-V-FITC (-)7-AAD (-) cells), early apoptotic (Annexin-V-FITC (+)7-AAD (-) cells), late apoptotic (Annexin-V-FITC (+)7-AAD (+) cells), and necrotic cells (Annexin-V-FITC (-)7-AAD (+) cells) were evaluated by Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>).

### 2.7. Determination of Superoxide Anion Radical (NBT Assay)

The concentration of superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) in the sample was determined by spectrophotometric method [26] and is based on the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) to nitroblue-formazan in the presence of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Assay was performed by adding 20  $\mu\text{L}$  of 5  $\text{mg mL}^{-1}$  NBT to each well followed by the cell incubation for 45 min at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ . To quantify the formazan production, formazan was solubilized in 20  $\mu\text{L}$  SDS-HCl (10% SDS in 0.01 M HCl). The concentrations were expressed in  $\text{nmol mL}^{-1}$ .

### 2.8. Determination Of Hydrogen Peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ Assay)

To determine the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cell membranes were broken by sonication of the cell suspension on ice with a series of 10 successive acoustic shocks. The samples were then centrifuged for 20 min at 10 000  $\times g$  at 4 °C. The determination of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration was based on oxidation of phenol red in the presence of horseradish peroxidase as a catalyst [27]. 50  $\mu\text{L}$  of the supernatant is added to 50  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture consisting of 0.28 mM Phenol Red + horseradish peroxidase - HRPO type II enzyme

(1  $\mu\text{M L}^{-1}$ ). The reaction mixture was incubated for an hour at 37 °C. A series of standard solutions of hydrogen peroxide passed through the same procedure. The concentrations were expressed in  $\text{nmol mL}^{-1}$ .

### 2.9. Determination of Glutathione

For measuring the concentrations of reduced glutathione (GSH) and total glutathione the samples were obtained by the following procedure: the cell suspension was centrifuged for 10 min at 1000  $\times g$  and 4 °C and after the removal of supernatant, the pellet was resuspended in 2.25% sulfosalicylic acid. Cell membranes were lysed by alternate freezing (- 80 °C) and thawing (37 °C) in three cycles for 15 min followed by 30 min of centrifugation at 1000  $\times g$ . The supernatant was used for further analysis. The assay is based on oxidation of a GSH by a DTNB reagent, with an active thiol group, which forms a yellow product of 5'-thio-2-nitrobenzoic acid [28].

The levels of total glutathione were determined by combining the sample solution with phosphate EDTA buffer (pH 7.4, 150  $\mu\text{L}$ ), 0.7 U GSH reductase, 1 mM NADPH and 1 mM DTNB in DMSO (1%). Color reaction was measured spectrophotometrically on a microplate reader at 405 nm following incubation for 10 min. Concentrations of total glutathione were calculated from a standard curve constructed with determined concentrations.

The concentrations of oxidized glutathione (GSSG) were calculated as difference between the values of total glutathione and reduced glutathione. All concentrations were expressed in  $\text{nmol mL}^{-1}$ .

### 2.10. Determination of Nitrites (Griess Assay)

The spectrophotometric determination of nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) as indicator of the nitric oxide (NO) level was performed by using the Griess method [29]. Griess reaction is based on coupling of NO-generated diazonium ion with N-(1-naphthyl) ethylenediamine where a chromophoric product is formed. Equal volumes of 0.1% (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% (10  $\text{mg mL}^{-1}$ ) sulfanilamide solution in 5% phosphoric acid were mixed together to form the Griess reagent immediately prior to application to the plate. After 10 min incubation in dark the absorbance was measured at 550 nm. The concentrations of nitrite were calculated from the standard curve for nitrite and expressed in  $\text{nmol mL}^{-1}$ .

### 2.11. Transwell Assay for Cell Migration

The cell migration capacity was determined by the ability of cells to pass the pores of polycarbonate membranes (pore size 8  $\mu\text{m}$ ; Greiner Bio-One, Switzerland) at the bottom of transwell chambers. The migration test was performed according to protocol described by Chen [30]. The cells were exposed to 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  concentrations of compounds **0**, **3**, and **4** for 24 h, 48 h, and 72 h, respectively. The control cells were cultured only in DMEM. After the compound's exposures, all groups of treated cells were trypsinized and placed in the upper chambers at a density of 1  $\times$  100 000 cells/well in 500  $\mu\text{L}$  of DMEM with 10% FBS. The lower chambers of the control cells contained 750  $\mu\text{L}$  of DMEM supplemented with 10% FBS whereas the lower chambers with treated cells were filled with 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  concentration of compounds **0**, **3**, and **4** diluted in 750  $\mu\text{L}$  of DMEM supplemented with 10% FBS. After 6 h of incubation at 37 °C, the cells from the upper surface of the filter were completely removed with gentle swabbing. The remaining migrated cells were fixed for 20 min at room temperature in 4% paraformaldehyde and stained with 0.1% crystal violet in 200 mM 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (pH 6.0) for 10 min. 10% acetic acid dissolved the dye and the absorbance was measured at 595 nm. The migration index was calculated as the ratio of absorbance of the treated samples divided by the absorbance of the non-treated control cell value and multiplied by 100 to give the percentage.

### 2.12. Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Total cell RNA was isolated from cells using TRIzol reagent according to Chomczynski and Sacchi protocol [31]. Total RNA was extracted by homogenization of trypsinized cells at room temperature. After homogenization, chloroform was added, and the tubes were mixed vigorously and centrifuged at  $10\,000 \times g$  on  $4^\circ\text{C}$  for 20 min. Total RNA was precipitated from the aqueous phase with an equal volume of isopropanol and pelleted by centrifugation at  $13\,000 \times g$  for 10 min at room temperature. Pellets containing RNA were washed once with 75% ethanol and resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of RT-PCR grade water. The purity and concentrations and of the obtained RNA were evaluated spectrophotometrically by measuring solution absorbance at 260 and 280 nm. The  $A_{260}/A_{280}$  ratio of the samples was  $\geq 1.8$ . 2  $\mu\text{g}$  of extracted RNA from each sample were reverse transcribed using Superscript II RT enzyme (Invitrogen) in a total reaction volume of 20  $\mu\text{L}$ . The obtained complementary DNA (cDNA) was PCR-amplified and the final 20  $\mu\text{L}$  reaction volume contained 0.5  $\mu\text{M}$  primers, 1 x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 2  $\mu\text{L}$  of the cDNA. cDNA amplification was performed by qRT-PCR method (quantitative real time PCR) in 7500 Real Time System (Thermo Fisher Scientific) using the following primer pairs:  $\beta$ -actin forward primer 5'-GTTCTCAAGGCACAGGTCTC-3', reverse primer 5'-GGGAGACCAAAAGCCTTCAT-3', iNOS forward primer 5'-GTTCTCAAGGCACAGGTCTC-3', reverse primer 5'-GCAGGTCACCTATGTCACCTATC-3', COX-2 forward primer 5'-CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA-3', reverse primer 5'-GCCCTCGCTTATGATCTGTC-3', MMP-9 forward primer 5'-ACCTCGAACTTTGACAGCGACA-3', reverse primer 5'-GATGCCATTACGTCGTCCTTA-3'.

The qPCR reaction program was set in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems): activation of the polymerase for 3 min at  $95^\circ\text{C}$ , 40 cycles of 15 sec at  $95^\circ\text{C}$  and 60 sec at  $55^\circ\text{C}$ . Relative expression value was calculated according to

formula  $\Delta\text{CT} - \Delta\Delta\text{CT}$  where  $\Delta\text{CT}$  refers to the difference between the cycle threshold values (CT) obtained for the target gene in treatment sample and non-treated control respectively, and  $\Delta\Delta\text{CT}$  represents the difference of  $\beta$ -actin gene expression levels (endogenous control) [32]. The negative control samples (without cDNA) were also amplified in qPCR reaction to confirm that the contamination with genomic DNA was in the acceptable range [33]. The results were expressed as percentage of the change compared to control values.

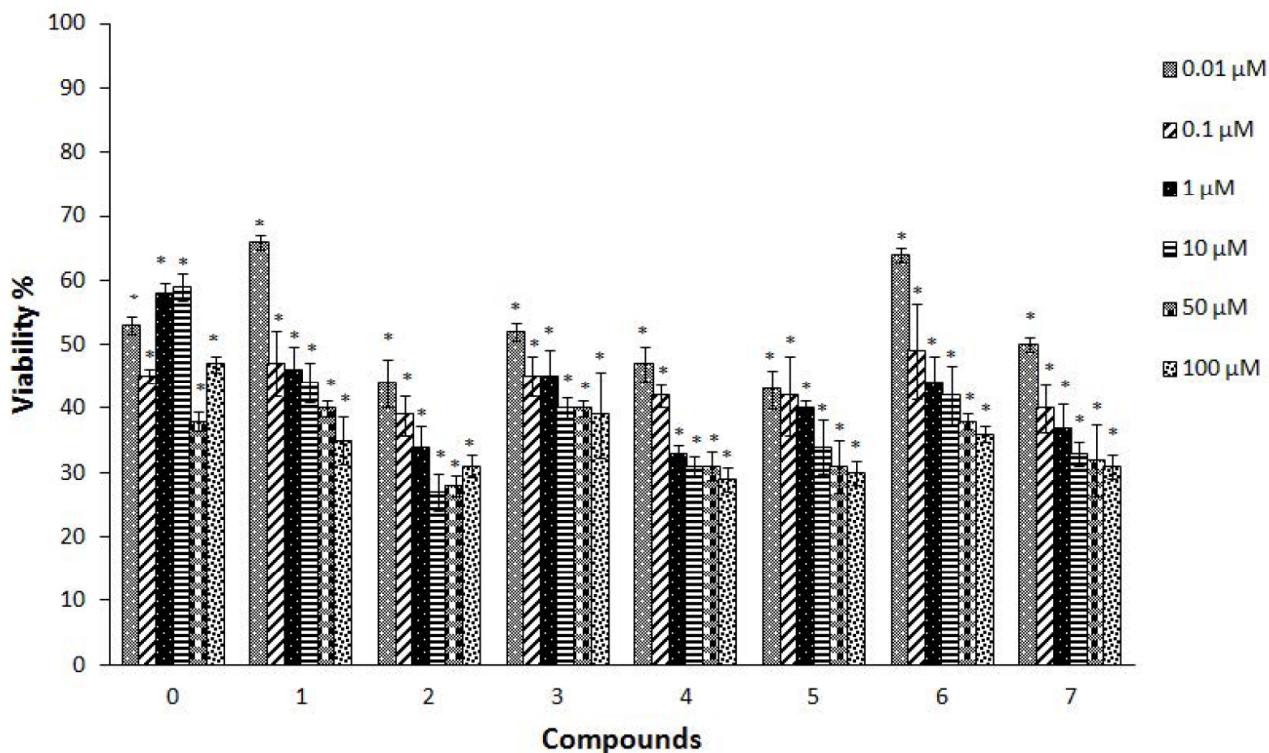
### 2.13. Statistical Analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SE. Statistical evaluation was calculated by Paired Sample T-Test. The SPSS statistical software package (SPSS for Windows, ver. 17 Chicago, IL) was used for statistical analysis. For all comparisons  $p < 0.05$  for control vs. compound was considered significant. The obtained values are result of three individual experiments performed in triplicate for each dose.

## 3. RESULTS

### 3.1. Determination of Biocompatibility

The effect of investigated hydantoin derivatives on the proliferation potential of the normal human fibroblast cell line, MRC-5 during 24 h was measured by MTT test. It was used to estimate the biocompatibility of these derivatives. The results showed a satisfying biocompatibility of tested compounds. The proliferation level of cultivated MRC-5 cells in the presence of examined hydantoin derivatives was higher than 85% compared to non-treated cells. Accordingly, biocompatibility analysis clearly demonstrated that the tested hydantoin derivatives did not have a strong non-specific toxic effect and only slightly affected normal human fibroblast cells, qualifying them as suitable molecules for further biological investigation for their potential application as anti-proliferative/anti-tumor agents.



**Fig. (3).** Effect of investigated compounds on proliferation of HCT-116 cells after 72 h. The results are expressed as % of viable cells compared to non-treated control cells (100%) and presented as mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).

### 3.2. Determination of Cell Proliferation

In our previous study [20] compound 3-benzyl-5,5-diphenylhydantoin marked as compound **0** showed the strongest anti-proliferative activity in the investigated series of compounds. Accordingly, this compound was used for comparison with the new series of isopropyl-phenyl hydantoin derivatives. The data presented in Fig. (3) shows anti-proliferative effects of these compounds against HCT-116 cells after 72 h of incubation with various concentrations of hydantoin derivatives. Treatment with all compounds at different concentrations showed significant anti-proliferative activities on HCT-116 cells compared to the non-treated cells in all three times (data for 24 h and 48 h shown in Supplementary Tables S1 and S2). The compounds showed a significant dose- and time-dependent inhibition of HCT-116 cell proliferation. Anti-proliferative activity of compound **3** was the highest after 24 h treatment and compound **4** showed the strongest effects after 48 h and 72 h of incubation.

Based on this data, these molecules could be applicable for further *in vivo* investigation. Results of *in vitro* anti-proliferative activity of all investigated compounds on HCT-116 cells were expressed as IC<sub>50</sub> values in Table 1. After 72 h treatment of HCT-116 cells, all examined compounds showed stronger anti-proliferative activity compared to activity after 24 h and 48 h of treatment. While the same treatment with all compounds showed higher anti-proliferative potential compared to compound **0**, and all of them have IC<sub>50</sub> values less than 0.5 μM.

### 3.3. Determination of Cell Apoptosis by Annexin V-FITC/7-AAD Staining

Apoptosis is a highly regulated process of cell death and is crucial in maintaining tissue homeostasis, as well as in preventing carcinogenesis. Apoptosis-inducing agents are expected to be successful anti-tumor drugs since apoptosis is a protective mechanism against cancer development that acts to remove genetically damaged cells from the tissue before they undergo clonal expansion [34]. The type of cell death was determined by flow cytometric analysis of treated cells stained with Annexin V FITC and 7-AAD. HCT-116 cells were treated for 24 h, 48 h, and 72 h with 1 μM and 10 μM concentrations of selected derivatives (**0**, **3**, and **4**). At both examined concentrations, all three compounds showed statistically significant time- and dose-dependent pro-apoptotic effect in HCT-116 cells, and in Fig. (4) the data for 72 h treatment has been shown.

**Table 1.** The half-maximal inhibitory concentration IC<sub>50</sub> (μM) of investigated compounds against HCT-116 cells determined by MTT assay.

No.	24 h	48 h	72 h
<b>0</b>	19 ± 0.2	11 ± 0.1	2 ± 0.02
<b>1</b>	63 ± 0.2	8 ± 0.1	0.5 ± 0.10
<b>2</b>	>100	12 ± 0.1	0.0002 ± 0.07
<b>3</b>	49 ± 0.1	31 ± 0.1	0.01 ± 0.05
<b>4</b>	22 ± 0.2	10 ± 0.2	0.001 ± 0.08
<b>5</b>	50 ± 0.1	32 ± 0.2	0.0004 ± 0.06
<b>6</b>	58 ± 0.2	15 ± 0.2	0.35 ± 0.10
<b>7</b>	> 100	40 ± 0.1	0.002 ± 0.07

The cells were treated with various concentrations of investigated compounds during 24 h, 48 h, and 72 h. The results are expressed as the mean ± SE from three independent experiments performed in triplicate.

### 3.4. Determination of Superoxide Anion Radical Production (NBT Assay)

Oxidative stress induces a cellular redox imbalance which has been found to be present in various cancer cells, making the redox imbalance a possible oncogenic trigger. Permanent modifications of genetic material caused by “oxidative damage” incidents represent the first step involved in mutagenesis, carcinogenesis, and aging [35]. Accordingly, in this study, we have evaluated the effects of various concentrations of hydantoin derivatives on superoxide anion radical production by HCT-116 cells after 24 h, 48 h, and 72 h. This test showed that treatment with all compounds at different concentrations expressed significant inhibitory effect to O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by HCT-116 cells compared to the production by non-treated cells. The decreased production of superoxide anion radicals after the treatment may also be involved in expression of anti-proliferative effects of these compounds and their ability to induce apoptosis. All investigated compounds have shown anti-oxidative properties during all three periods of treatment, and the strongest effects were detected after 72 h treatment as shown in Supplementary Table S3.

### 3.5. Determination of Hydrogen Peroxide Production (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay)

Evidence suggests that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays an important role in cancer development [36]. In this study, the effects of various concentrations of hydantoin derivatives on hydrogen peroxide production by HCT-116 cells after 24 h, 48 h, and 72 h treatment have been evaluated. Treatment with all compounds at different concentrations showed the significant inhibitory effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by HCT-116 cells compared to the production by non-treated cells. The most potent effect of all three treatments has been shown for compound **4**, with compound **3** has also expressed considerable effect. The results obtained after 72 h treatment are presented in Supplementary Table S4.

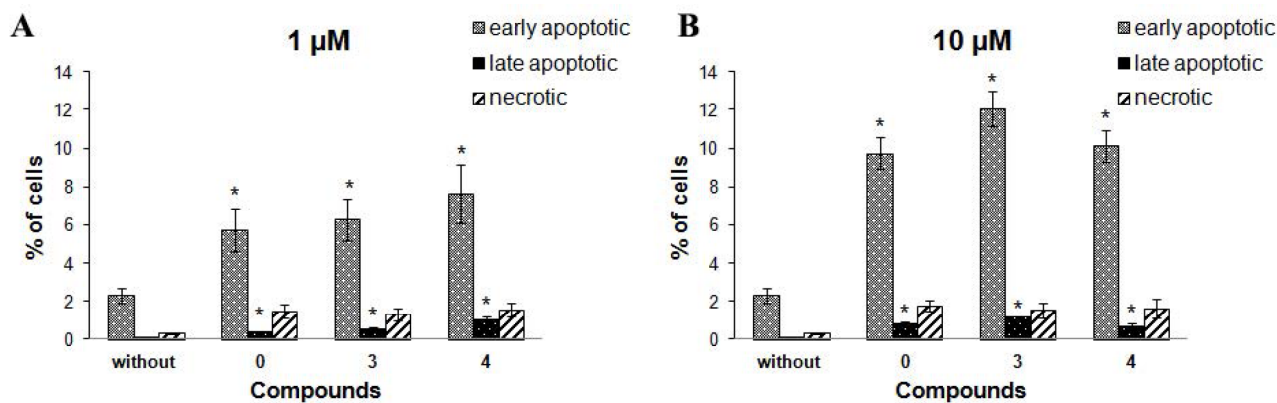
### 3.6. Determination of Total, Reduced and Oxidized Glutathione

Many studies showed that anti-oxidants could protect normal tissues from chemotherapy-induced damage without decreasing its anti-tumor efficiency. Some anti-oxidants may enhance the effects of cytotoxic regimes, improving the response rate of the tumor to a chemotherapeutic agent, as well [37]. The concentration of total, reduced, and oxidized glutathione after 24 h, 48 h, and 72 h of incubation with various concentrations of hydantoin derivatives, showed a significant increase in total and reduced glutathione levels compared to control, until oxidized glutathione decrease compared to non-treated cells. The strongest effects in elevation of total and reduced glutathione level have been shown for compounds **0**, **3**, and **4** compared to control, with compound **4** showing the greatest effects in decreasing of oxidized glutathione level. The concentrations of total, reduced, and oxidized glutathione after 72 h treatment are presented in Supplementary Tables S5, S6, and S7.

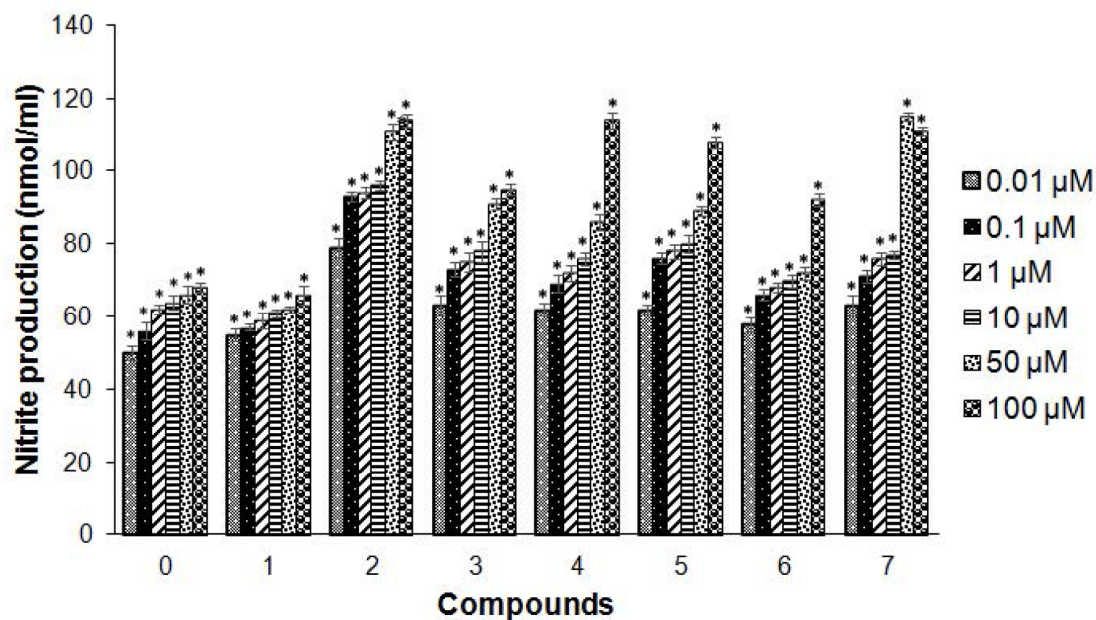
### 3.7. Determination of NO Production (Griess Assay)

The roles of NO relating to apoptosis, cell cycle, tumor progression, angiogenesis, and metastasis are currently detected at host-tumor interface since NO was found to be actively associated with tumors, as well as with the tumor environment, for example, the vasculature cells and other stromal cells. The tumor microenvironment includes stromal cells such as cells of the immune system and vascular tissue, and this microenvironment NO was established to be a factor of their activity [38]. Overall, the effect of NO depends on the expression level of inducible nitric oxide synthase (iNOS), duration and timing of NO delivery, the microenvironment, the genetic background, and the cell type [39]. The data shown in Fig. (5) present nitrite concentrations in supernatants of HCT-116 cells





**Fig. (4).** Flow cytometric analysis of Annexin V-FITC/7-AAD stained HCT-116 cells. The percentages of early apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>), late apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>), and necrotic cells (Annexin V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) in non-treated and treated cells with investigated compounds. The cells were treated with compounds concentrations 1  $\mu$ M (A) and 10  $\mu$ M (B) after 72 h. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p$ <0.05 cells treated with different concentrations of compound vs. control).



**Fig. (5).** Effect of investigated compounds on the nitrite level in supernatants of HCT-116 cells after 72 h treatment compared to non-treated control cell. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p$ <0.05 different concentrations of compound vs. control).

incubated with various concentrations of tested hydantoin derivatives after 72 h. Treatment with all compounds showed the significant increase in production of NO by HCT-116 cells measured indirectly by nitrite level in supernatants compared to the level in supernatants of non-treated cells. The strongest activity has been shown by compound **3** after 24 h of treatment, while after 48 h and 72 h of treatment, compound **4** showed the strongest effects. The results obtained after 24 h and 48 h of treatment are shown in Supplementary Tables S8 and S9.

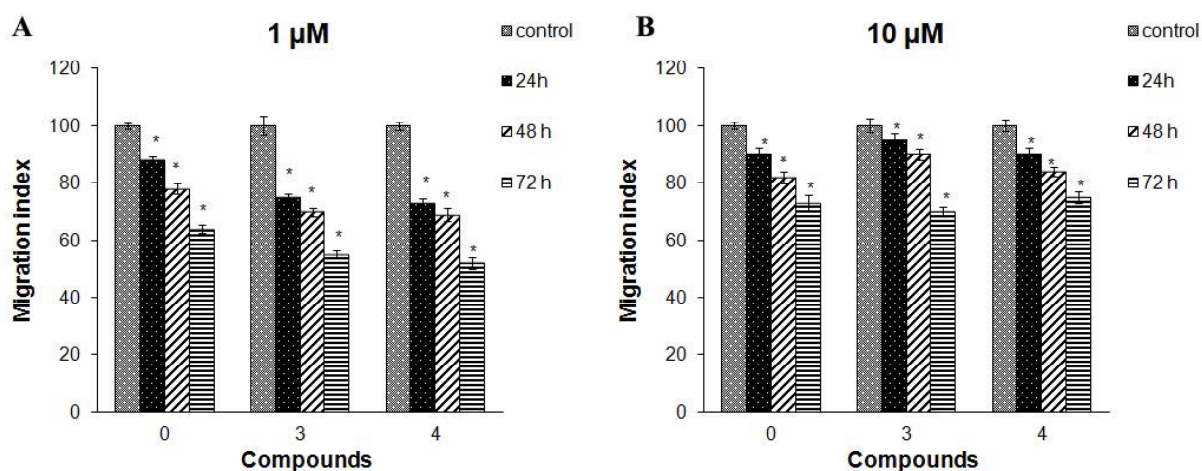
### 3.8. Migratory Potential (Boyden Chamber Assay)

To examine the effects of novel hydantoin derivatives on the migration capacity of human colon cancer cells, HCT-116, the trans-well migration assay was performed. Results in Fig. (6) showed a significant decrease in cell migration index of HCT-116 cells exposed to compounds **0**, **3**, and **4** during 24 h, 48 h, and 72 h, respectively, compared to the non-treated cells. Long-term exposure (72 h) to compounds **0**, **3**, and **4** induced a stronger reduction of

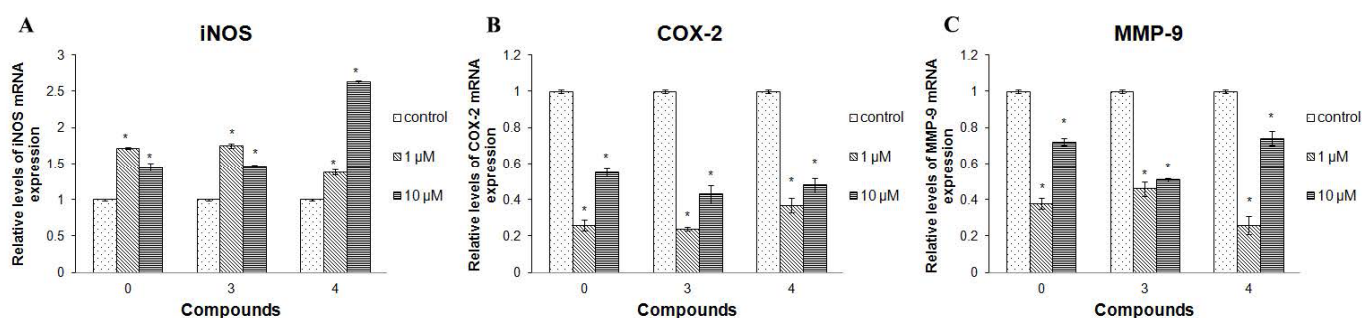
migration index compared to the other two treatments. These data indicate that the treatment with 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of these three selected hydantoin derivatives significantly reduces the migratory capacity of HCT-116 cells. Based on our results regarding ROS production, we can suggest that ROS levels present in cancer cells may have significant potential in promoting cancer cell migration and invasion, which is in accordance with literature data [40].

### 3.9. Gene Expression

In our study, the levels of expression of the genes important for the regulation of migration/invasion of colon cancer cells have been evaluated. The expression levels were determined by qRT-PCR method using the SYBR green dye that generates the fluorescent signal and quantifying the amount of expressed mRNA (mRNA). The expression of the genes was determined after long-lasting treatment (72 h) since the strongest effects on motility of HCT-116 cells are detected after 72 h of treatment.



**Fig. (6).** Effect of investigated compounds on migration capacity of human colorectal cancer HCT-116 cells. The cells were treated with selected compounds at concentrations of 1  $\mu\text{M}$  (A) and 10  $\mu\text{M}$  (B) during 24 h, 48 h, and 72 h. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).



**Fig. (7).** Relative levels of iNOS (A), COX-2 (B), and MMP-9 (C) mRNA expression following treatment of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  investigated compounds in HCT-116 cells after 72 h. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).

### 3.9.1. Expression of the Inducible Nitrite Oxide Synthase (iNOS) Gene

One of the key genes involved in tumorigenesis is iNOS that generates NO molecule in significant amounts in colon cancer cell. Fig. (7) shows changes induced by the tested hydantoin derivatives **0**, **3**, and **4** in the iNOS expression profile of HCT-116 cells. The results show that long-term treatment (72 h) with all three hydantoin derivatives at concentrations 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  caused the statistically significant increase in iNOS gene expression compared to non-treated cells.

### 3.9.2. Expression of Cyclooxygenase 2 Gene (COX-2) Gene

Literature data suggested that COX-2 may play a role in different steps of cancer progression by increasing the proliferation of mutated cells, and/or by inhibiting apoptosis thus affecting the efficacy of anticancer therapies. It has also been implicated in metastasis formation by affecting apoptosis induced by loss of cell anchorage-anoikis [41]. In Fig. (7) are presented the effects of selected derivatives **0**, **3**, and **4** in the concentrations of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  on the expression level of COX-2 gene in HCT-116 cells after long-term exposure (72 h). The results show that the treatment with these three derivatives in both investigated concentrations caused the statistically significant reduction in COX-2 gene expression compared to control cells.

### 3.9.3. Gene Expression for Metalloproteinase 9 (MMP-9) Gene

The role of metalloproteinase as an important cell invasion marker has been implicated in colorectal cancer cell dissemination

[42]. The changes induced by selected hydantoin derivatives **0**, **3**, and **4** on the level of expression of the MMP-9 gene are presented in Fig. (7). The results show that long-term treatment of 72 h of compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  leads to a statistically significant reduction in the expression of MMP-9 gene compared to the levels in non-treated cells.

## 4. DISCUSSION

Hydantoin derivatives are the group of biologically active compounds with anti-convulsive, anti-inflammatory, anti-hypertensive, and since recently, anti-tumor properties [43, 44]. Since many studies have shown a considerable correlation between moieties at the basic hydantoin ring structure and their biological effects several recent investigations are focused on the synthesis of novel modified derivatives with the aim of extending their existing biological activities [45] and anti-tumor effects.

In the present study, the effects of seven newly synthesized hydantoin derivatives with variable benzyl- moieties at N-3 atom of hydantoin core ring on proliferation ratio of human colorectal cancer cells, HCT-116 have been investigated, since in the previous series of hydantoin compounds N-3 derivatives with benzyl substituent exerted the strongest anti-proliferative properties [20]. According to anti-oxidative effects of hydantoin derivatives from our previous study [21], one of the aims of present experiment was evaluation of anti-tumor activity of the compound with the most intense anti-oxidative effects from the previous study (3-benzyl-5,5-diphenylhydantoin marked as compound **0**) and of newly synthesized compounds with the strongest anti-oxidative and anti-



proliferative effects (derivatives **3** and **4**). As well as comparison of the intensity of their effects on different parameters of colon cancer cell metabolism. All novel derivatives exhibited stronger anti-proliferative activity compared to compound **0**. Overall, the strongest anti-proliferative outcomes in this study have been detected in the concentrations of 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  which was the reason for selecting these concentrations for further detailed testing.

For the first, all investigated derivatives have shown a satisfying biocompatibility performed on human lung fibroblast MRC-5, suggesting their considerable selectivity in inhibition of cell cycle between cancer and health cells. All examined hydantoin derivatives exerted strong anti-proliferative activities in considerable dose- and time-dependent manner against HCT-116 cells until the concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The compounds **3** and **4** have exhibited generally strongest anti-proliferative effect among the other investigated derivatives. The study conducted by Kumar and coworkers has shown significant inhibitory effect of certain diazaspino-bicyclo hydantoin derivatives on proliferation of human leukemia K562 and CEM cell lines [12].

ROS play key roles in many cell processes essential for maintaining of cell homeostasis but can also be involved in different aspects of tumorigenesis, such as cell invasion, and metastasis [46]. Hydantoin derivatives tested in this study have been shown to exhibit intense anti-oxidative potential and to significantly reduce the production of ROS by HCT-116 cell line. The involvement of ROS signaling in tumor metastasis was highlighted [47]. The cancer cells produce high amounts of  $\text{H}_2\text{O}_2$  that has been linked to several key alterations in cancer. Additionally, the malignant phenotype of cancer cells can be reversed just by decreasing the cellular levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  [36]. In the line with this data are the results obtained in this study where all investigated compounds at all tested concentrations have shown the significant decrease in  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by HCT-116 cells. Compounds **3** and **4** showed the strongest reduction of  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations, compared to the other investigated compounds. Since the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  depends on  $\text{O}_2^-$  levels, this compliance is expected. The scavenging potential of the investigated compounds might be in correlation with their structure because the different decrease ratios in  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels were noticed in different compounds. Further, the effect of new hydantoin derivatives on the levels of glutathione as one of the most important non-enzymatic, anti-oxidative components of the cell were detected. Glutathione and its oxidized form, GSSG, represent an important marker of the cell redox status [48]. The increased levels of total glutathione supernatants of cells treated with all tested compounds, after three experimental times (24 h, 48 h, and 72 h) was noted. The strongest effect among all tested derivatives exhibited the compound **0**, **3**, and **4** which is in correlation with their strongest previously showed anti-oxidative potential ( $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  production). Elevated levels of total and reduced glutathione determined in this study may indicate that these hydantoin derivatives induced *de novo* synthesis of GSH. In line with this hypothesis is the fact that *de novo* synthesis of GSH in the cells is induced by various antioxidants [49, 50]. The GSH reacts with ROS or functions as a cofactor of anti-oxidative enzymes, leading to the protection of functions of redox-sensitive molecules. The reduced GSSG level and elevated GSH/2GSSG ratio in supernatants of treated HCT-116 cells indicate the strong anti-oxidative potential of tested compounds. The decreased level of GSSG could be induced by decreased oxidative species production and/or by stimulating the activity of glutathione reductase as an important anti-oxidative enzyme. Accordingly, in HCT-116 cells, treatment with all tested hydantoin compounds caused consequently an increase in the total GSH content. These data strongly indicate that hydantoin derivatives used in our study could stimulate cell anti-oxidative capacities and that GSH *de novo* synthesis could represent one of the mechanisms of anti-tumor effect of these compounds.

Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule in numerous physiological and pathological processes with the controversial role in colon carcinogenesis and progression [51]. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been reported to be both up-regulated and down-regulated in colorectal cancer studies in both animal models and human tissue samples [51]. The anti-tumor or pro-tumor effect of NO depends on timing, concentration, and type of cancer tissue [52]. All the treatments in this study induced significantly increased NO level in supernatants of HCT-116, while the migration index of treated cells decreased. Based on these data, it may be proposed that one of the mechanisms by which investigated compounds reduce the migratory potential of human colon cancer cells is by elevating bioavailability of NO. This molecule is involved in regulation of the function of cell adhesion molecules, presumably the integrins, important for cell motility. Increased NO level can be partly explained by the fact that NO has a half-life of only several seconds in an environment rich in superoxide anion radical; surrounded by low levels of superoxide anion radical (such as in this study), NO has much greater stability [27]. Accordingly, since all investigated compounds decrease the oxidative stress level, including  $\text{O}_2^-$  concentration, this could be a cause of increased concentration of NO in all treatments. Additional mechanism may be mediated by superoxide radical which can react rapidly with NO producing peroxynitrite, where strong depletion of  $\text{O}_2^-$  levels probably decreased the ratio of peroxynitrite formation and elevated the bioavailability of NO [39]. The results of this study show that long-term treatment of 72 h of HCT-116 with selected hydantoin derivatives (**0**, **3**, and **4**) caused a statistically significant increase in iNOS gene expression compared to control non-treated cells which could indicate that strong elevation in NO levels is caused by *de novo* synthesis and/or increase of its bioavailability.

Recently, the activity of spirohydantoin derivatives was determined to be pro-apoptotic on ovarian and breast cancer cell lines [53]. Based on the result achieved in the proliferation test, the pro-apoptotic potential of compound **0**, **3**, and **4** in HCT-116 cells was evaluated. Treatment with all three compounds resulted in dose- and time-dependent increases in the number of apoptotic cells. The main type of cell death in HCT-116 cells, induced by three selected hydantoin derivatives, was apoptosis, while a small statistically insignificant portion of necrotic cells was detected. Since the aim of cancer therapy is to induce apoptosis of cancer cells [54], obtained results suggest that these investigated hydantoin derivatives could be of considerable interest in further researches in developing more efficient chemotherapies.

Migration potential of cancer cells is a crucial aspect of tumor development which is one of the reasons for targeting cell motion ability in different anti-tumor strategies. The treatment with investigated hydantoin derivatives (compounds **0**, **3**, and **4**) reduced the migration capacity of HCT-116 cells. The treatment with 1  $\mu\text{M}$  concentration of selected compounds induced stronger inhibition of migratory capacity of cells compared to treatment with the higher concentration (10  $\mu\text{M}$ ). This effect could be caused by different pathways involved in cell motility process, significantly disturbed by ROS level decrease and excessive NO production induced by iNOS present in the treatments. Expression of iNOS can be induced by lipopolysaccharide and various cytokines, and in different pathological conditions, it is regarded as a harmful enzyme [45]. iNOS has been described to be a mediator of metastasis in different cancer types as well [55]. Presented data showed that treatments with selected investigated derivatives decreased the migration capacity of HCT-116 and on the other side elevated NO production, which could indicate the significant role of NO in migration mechanisms of these cells. Although most of the studies have reported invasion-promoting effects of NO in various cell types, there are several studies which reported anti-migratory and anti-proliferative effects of NO [56, 57].

Overexpression of COX-2 has been detected in colorectal, breast, pancreatic, and lung cancers, where it correlates with a poor clinical prognosis [41, 58]. COX-2 and the prostaglandin cascade pathways play an important role in the “inflammogenesis of cancer” [58]. Literature data suggest that COX-inhibitors can reduce tumor evasion of immune system and therefore could represent reinforcement to standard cytotoxic therapy [58]. Our results show that the treatment with hydantoin derivatives **0**, **3**, and **4** caused a statistically significant reduction in COX-2 gene expression compared to non-treated HCT-116 cells, while the compound **3** and **4** exhibited the stronger reduction of COX-2 gene expression. These results indicate that all three compounds reduce this parameter of inflammation which could be one of the possible mechanisms of their anti-tumor activity. COX-2 is important in colorectal carcinogenesis and its relationship with NO has been studied in colon cancer [51]. NO has regulatory effect, either stimulatory or inhibitory, on the COX-2 gene expression level and activity of the enzyme [59, 60]. The reduction of COX-2 gene expression level compared to control cells is stronger at the concentration of 1  $\mu$ M compared to 10  $\mu$ M, which could be due to the strong dose-dependent elevation of NO levels induced by the treatment.

Matrix metalloproteinases (MMPs) represent crucial enzymes in cancer cell invasion, also active in normal cells during tissue remodeling processes [61]. The inhibition of MMPs is the key target of numerous cancer therapy strategies. The role of MMPs as biomarkers of colorectal cancer stages and their use in monitoring of therapeutic responses in different individuals to a chemotherapeutic regimen, make these molecules an attractive target in developing of more effective chemotherapeutic approaches [62]. The results show that long-term treatment (72 h) of HCT-116 cells with three selected hydantoin derivatives (**0**, **3**, and **4**) leads to a statistically significant reduction in the expression of the MMP-9 mRNA compared to control cells, while the compound **3** and **4** have shown the stronger reduction of MMP-9 expression. These data suggest that these compounds have significant potential in reducing the invasion capacity of HCT-116 cells.

## CONCLUSION

Despite various new therapeutic approaches, chemotherapy remains the most common form of colon cancer treatment. Its main limitations are the considerable toxicity of commonly used chemotherapeutics and increasing resistance of cancer cells. The investigated newly synthesized hydantoin derivatives have shown significant anti-tumor activity against colon cancer cells line, HCT-116 cells measured by different parameters. All tested compounds exerted significant anti-proliferative, pro-apoptotic, and anti-oxidative effects against HCT-116, in the dose- and time-dependent manners as one of the most important anti-tumor mechanisms. These compounds have provoked the reduction of cell migration and invasion capacity and exhibited significant selectivity in the inhibition of proliferation between cancer cells and non-malignant cells. Based on our results the novel hydantoin derivatives exerted stronger anti-tumor effects in human HCT-116 cells compared to compound **0** from previous study, suggesting that replacement of phenyl group with isopropyl group could potentiate the colon cancer-inhibiting effects, making these molecules a promising candidate for further researches in *in vivo* animal models with the aim of developing more efficient anti-tumor drugs.

## ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

## HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

## CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

## AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

## FUNDING

None.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by the Ministry of Education and Science, and Technological Development of the Republic of Serbia, grants III41010, 173041 and [173052](#).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

## REFERENCES

- Vamecq, J.; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P.; Delcourt, P.; Stables, J.P. Synthesis and anticonvulsant and neurotoxic properties of substituted N-phenyl derivatives of the phthalimide pharmacophore. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1311-9.
- Herrera, J.A.; Ward, C.S.; Pitcher, M.R.; Percy, A.K.; Skinner, S.; Kaufmann, W.E.; Glaze, D.G.; Wehrens, X.H.; Neul, J.L. Treatment of cardiac arrhythmias in a mouse model of Rett syndrome with Na<sup>+</sup>-channel-blocking antiepileptic drugs. *Dis Model Mech.*, **2015**, *8*, 363-371.
- Thenmozhiyal, J.C.; Wong, P.T.; Chui, W.K. Anticonvulsant activity of phenylmethylenhydantoins: A structure-activity relationship study. *J Med Chem*, **2004**, *47*, 1527-1535.
- Jintao, H.; Hongbo, D.; Zhihong, X.; Jianping, L.; Mingan, W. Facile Synthesis of 5-Arylidene Thiohydantoin by Sequential Sulfonation/Desulfination Reaction. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*, 12484-12495.
- Marinova, P.; Marinov, M.; Kazakova, M.; Feodorova, Y.; Slavchev, A.; Blazheva, D.; Georgiev, D.; Penchev, P.; Sarafian, V.; Stoyanov, N. Study on the synthesis, characterization and bioactivities of 3-methyl-9'-fluorenespiro-5-hydantoin. *Acta Chim Slov*, **2016**, *63*, 26-32.
- Siegel, R.; Desantis, C.; Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, **2014**, *64*, 104-117.
- Haraldsdottir, S.; Einarsdottir, H.M.; Smaradottir, A.; Gunnlaugsson, A.; Halfdanarson, T.R. Colorectal cancer-review. *Laeknabladid*, **2014**, *100*, 75-82.
- Rajić, Z.; Zorc, B.; Raic-Malic, S.; Ester, K.; Kralj, M.; Pavelic, K.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Mintas, M. Hydantoin derivative of L- and D-amino acids: synthesis and evaluation of their antiviral and antitumoral activity. *Molecule*, **2006**, *11*, 837-848.
- Kavitha, C.V.; Nambiar, M.; Ananda Kumar, C.S.; Choudhary, B.; Muniyappa, K.; Rangappa, K.S.; Raghavan, S.C. Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, **2008**, *77*, 348-363.
- Carmi, C.; Cavazzoni, A.; Zuliani, V.; Lodola, A.; Bordi, F.; Plazzi, P.V.; Mor, M. 5-Benzylidene-hydantoins as new EGFR inhibitors with antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem Lett*, **2006**, *16*, 4021-4025.
- Cavazzoni, A.; Alfieri, R.R.; Carmi, C.; Zuliani, V.; Galetti, M.; Fumarola, C.; Frazzi, R.; Bonelli, M.; Bordi, F.; Lodola, A.; Mor, M.; Petronini, P.G. Dual mechanisms of action of the 5-benzylidene-hydantoin UPR1024 on lung cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.*, **2008**, *7*, 361-370.
- Kumar, C.S.A.; Prasad, S.B.; Vinaya, K.; Chandrappa, S.; Thimmegowda, N.R.; Ranganatham, S.R.; Swarup, S.; Rangappa, K.S.

- Synthesis and antiproliferative activity of substituted diazaspiron hydantoins: A structure-activity relationship study. *Invest New Drugs*, **2009**, *27*, 131-139.
- [13] Cano, I.; Selivanov, V.; Gomez-Cabrero, D.; Tegnér, J.; Roca, J.; Wagner, P.D.; Cascante, M. Oxygen pathway modeling estimates high reactive oxygen species production above the highest permanent human habitation. *PLoS One*, **2014**, *9*(11), e111068.
- [14] Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.*, **2006**, *5*, 14.
- [15] Jie, L.; Wuliji, O.; Wei, L.; Zhi-Gang, J.; Ghanbari, H.A. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*, 24438-24475.
- [16] Naziroglu, M. Role of melatonin on calcium signaling and mitochondrial oxidative stress in epilepsy: Focus on TRP channels. *Turk. J. Biol.*, **2015**, *39*, 813-821.
- [17] Liou, G.Y.; Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res*, **2010**, *44*, 479-496.
- [18] Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, **2009**, *8*, 579-91.
- [19] Behrend, L.; Henderson, G.; Zwacka, R.M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.*, **2003**, *31*(Pt 6), 1441-1444.
- [20] Trišović, N.; Božić, B.; Obradović, A.; Stefanović, O.; Marković, S.; Čomić, Lj.; Božić, B.; Ušćumlić, G. Structure-activity relationships of 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins as potential antiproliferative and antimicrobial agents. *J. Serb Chem Soc*, **2011**, *76*, 1597-1606.
- [21] Obradović, A.; Žižić, J.; Trišović, N.; Božić, B.; Ušćumlić, G.; Božić, B.; Marković, S. Evaluation of anti-oxidative effects of twelve 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins on human colon cancer cell line HCT-116. *Turk. J. Biol.*, **2013**, *37*, 741-747.
- [22] Gupta, G.P.; Massagué, J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell*, **2006**, *127*, 679-695.
- [23] Bucherer HT, Lieb VA. Über die bildung substituierter hydantoine aus aldehyden und ketonen. synthese von hydantoinen. *J. Prakt. Chem.*, **1934**, *5*, 141.
- [24] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55-63.
- [25] Shounan, Y.; Feng, X.; O'Connell, P.J. Apoptosis detection by annexin V binding: A novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, **1998**, *217*, 61-70.
- [26] Auclair, C.; Voisin, E. Nitroblue tetrazolium reduction, in Greenwald, R. A. (Eds.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, BocaRaton, CRC Press, **1985**; pp. 123-132.
- [27] Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Method*, **1980**, *38*, 161-170.
- [28] Baker, M.A.; Cerniglia, G.J.; Zaman, A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.*, **1990**, *190*, 360-365.
- [29] Griess, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*, **1879**, *12*, 426-428.
- [30] Chen, H.C. Boyden chamber assay. *Methods Mol. Biol.*, **2005**, *294*, 15-22.
- [31] Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **1987**, *162*, 156-159.
- [32] Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Method*, **2001**, *25*, 402-408.
- [33] Cheeseman, K.; Rouleau, E.; Vannier, A.; Thomas, A.; Briaux, A.; Lefol, C.; Walrafen, P.; Bensimon, A.; Lidereau, R.; Conseiller, E.; Ceppi, M. A diagnostic genetic test for the physical mapping of germline rearrangements in the susceptibility breast cancer genes BRCA1 and BRCA2. *Hum Mutat*, **2012**, *33*, 998-1009.
- [34] Hassan, M.; Watari, H.; Abu Almaaty A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, *2014*, 150845.
- [35] Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, *39*, 44-84.
- [36] López-Lázaro, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett*, **2007**, *252*, 1-8.
- [37] Sak, K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemother Res Pract*, **2012**, *2012*, 282570.
- [38] Cook, T.; Wang, Z.; Alber, S.; Liu, K.; Watkins, S.C.; Vodovotz, Y.; Billiar, T.R.; Blumberg, D. Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53. *Cancer Res*, **2004**, *64*, 8015-8021.
- [39] Zhang, R.; Ma, A.; Urbanski, S.J.; McCafferty, D.M. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, **2007**, *28*, 1122-113.
- [40] Gupta, S.C.; Hevia, D.; Patchva, S.; Park, B.; Koh, W.; Aggarwal, B.B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid Redox Signal*, **2012**, *16*, 1295-1322.
- [41] Sobolewski, C.; Cerella, C.; Dicato, M.; Ghibelli, L.; Diederich, M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int J Cell Biol*, **2010**, *2010*, 215158.
- [42] Mc Donnell, S.; Chaudhry, V.; Mansilla-Soto, J.; Zeng, Z.S.; Shu, W.P.; Guillem, J.G. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production *in vivo*. *Clin Exp Metastasis*, **1999**, *17*, 341-9.
- [43] Basappa, Kumar, C.S.A.; Nanjunda Swamy, S.; Sugahara, K.; Rangappa, K.S. Anti-tumor and anti-angiogenic activity of novel hydantoin derivatives: Inhibition of VEGF secretion in liver metastatic osteosarcoma cells. *Bioorg Med Chem*, **2009**, *17*, 4928-34.
- [44] Kumar, C.S.A.; Veeresh, B.; Ramesha, K.C.; Raj, C.S.A.; Mahadevaiah, K.M.; Prasad, S.B.B. Synthesis and Evaluation of Novel Diazaspiro Hydantoins as Potential Anticonvulsants. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, **2017**, *17*, 201-208.
- [45] Jansen, M.; Potschka, H.; Brandt, C.; Löscher, W.; Dannhardt, G. Hydantoin-substituted 4,6-dichloroindole-2-carboxylic acids as ligands with high affinity for the glycine binding site of the NMDA receptor. *J Med Chem*, **2003**, *46*, 64-73.
- [46] Liu, H.; Liu, X.; Zhang, C.; Zhu, H.; Xu, Q.; Bu, Y.; Lei, Y. Redox Imbalance in the Development of Colorectal Cancer. *J Cancer*, **2017**, *8*, 1586-1597.
- [47] Wu, W.S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*, **2006**, *25*, 695-705.
- [48] Traverso, N.; Ricciarelli, R.; Nitti, M.; Marengo, B.; Furfaro, A.L.; Pronzato, M.A.; Marinari, U.M.; Domenicotti, C. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid. Med. Cell Longev*, **2013**, *2013*, 972913.
- [49] Shizhong, Z.; Fu, Y.; Anping, C. *De novo* synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit HSC activation. *Free Radic Biol Med*, **2007**, *43*, 444-453.
- [50] Majid, A.S.; Yin, Z.Q.; Ji, D. Sulphur antioxidants inhibit oxidative stress induced retinal ganglion cell death by scavenging reactive oxygen species but influence Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 signalling pathway differently. *Biol Pharm. Bull*, **2013**, *36*, 1095-1110.
- [51] Liu, Q.; Chan, S.T.; Mahendran, R. Nitric oxide induces cyclooxygenase expression and inhibits cell growth in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis*, **2003**, *24*, 637-42.
- [52] Rigas, B.; Williams, J.L. NO-donating NSAIDs and cancer: An overview with a note on whether NO is required for their action. *Nitric Oxide*, **2008**, *19*, 199-204.
- [53] Gomez-Monterrey, I.; Santelli, G.; Campiglia, P.; Califano, D.; Falasconi, F.; Pisano, C.; Vesci, L.; Lama, T.; Grieco, P.; Novelino, E. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel spirohydantoin derivatives of the dihydrothieno[2,3-b]naphtho-4,9-dione system. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1152-1157.
- [54] Shin, S.W.; Seo, C.Y.; Han, H.; Han, J.Y.; Jeong, J.S.; Kwak, J.Y.; Park, J.I. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows *in vivo* antitumor activity. *Clin Cancer Res*, **2009**, *15*, 5414-25.
- [55] Granados-Principal, S.; Liu, Y.; Guevara, M.L.; Blanco, E.; Choi, D.S.; Qian, W.; Patel, T.; Rodriguez, A. A.; Cusimano, J.; Weiss, H. L.; Zhao, H.; Landis, M. D.; Dave, B.; Gross, S. S.; Chang, J.C. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, **2015**, *17*, 25.

- [56] Kim, P.K.; Zamora, R.; Petrosko, P.; Billiar, T.R. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*, **2001**, *1*, 1421-1441.
- [57] Bove, P.F.; Hristova, M.; Wesley, U.V.; Olson, N.; Lounsbury, K.M.; van der Vliet, A. Inflammatory levels of nitric oxide inhibit airway epithelial cell migration by inhibition of the kinase ERK1/2 and activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Biol Chem*, **2008**, *283*(26), 17919-28.
- [58] Liu, B.; Qu, L.; Yan S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int*, **2015**, *15*, 106.
- [59] Pérez-Sala, D.; Lamas, S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal*, **2001**, *3*(2), 231-48.
- [60] Weinberg, J.B. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. *Immunol Res*, **2000**, *22*(2-3), 319-41.
- [61] Kessenbrock, K.; Wang, C.Y.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol*, **2015**, *44-46*, 184-90.
- [62] Said, A.H.; Raufman, J.; Xie, G. The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers*, **2014**, *6*, 366-375.



Contents lists available at ScienceDirect

Saudi Pharmaceutical Journal

journal homepage: www.sciencedirect.com



Original article

## Antiproliferative and antimigratory effects of 3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives in human breast cancer cells

Ana Obradović<sup>a</sup>, Miloš Matić<sup>a</sup>, Branka Ognjanović<sup>a</sup>, Predrag Đurđević<sup>b</sup>, Emilija Marinković<sup>c</sup>, Gordana Uščumlić<sup>d</sup>, Bojan Božić<sup>e,1</sup>, Biljana Božić Nedeljković<sup>e,\*,1</sup><sup>a</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia<sup>b</sup> Department of Internal Medicine, Clinic for Hematology Clinical Center Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia<sup>c</sup> Department of Research and Development, Institute of Virology, Vaccines and Sera – TORLAK, Belgrade, Serbia<sup>d</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia<sup>e</sup> Institute of Physiology and Biochemistry “Ivan Đaja”, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 August 2019

Accepted 19 January 2020

Available online 24 January 2020

## Keywords:

Hydantoin derivatives

Breast cancer cell line MDA-MB-231

Proliferation

Apoptosis

Cell motility

Nitric oxide

## ABSTRACT

In this study, a series of synthesized 3-(4-substituted benzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives as a potential antiproliferative and antimigratory agents were investigated. The possible antitumor mechanisms of investigated hydantoin derivatives were examined on human breast cancer cell line MDA-MB-231. The cells were treated with different concentrations of compounds (from 0.01 μM to 100 μM) during 24 h and 72 h. The proliferation index, nitric oxide production, apoptosis rate, and migration capacity were measured. The cell invasion potential was examined by measuring the level of MMP-9 and COX-2 gene expression. All tested compounds expressed antiproliferative activity and induced dose- and time-dependent increase in the level of nitrites. The investigated molecules significantly decreased cell survival rate, migration capacity and the expression levels of genes included in the process of tumor invasion. Obtained data suggest that the tested hydantoin derivatives express considerable antitumor activity by reducing cell division rate, elevating apoptosis level, and inhibiting the motility and invasiveness of breast cancer cells. The results obtained in this study indicate that investigated compounds express potential as a novel chemotherapeutic agents against breast cancer growth and progression.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer type and the second leading cause of cancer-related deaths in women across the world resulting in more than half a million deaths each year (Murad et al., 2016). Despite the extensive use of multimodal chemotherapies, the level of mortality remains high, emphasizing the need for novel therapeutic approaches with higher efficiency against malignant cells and advanced selectivity towards healthy tissues. Some studies showed that different heterocyclic compounds containing nitrogen atom exhibit significant antiproliferative activity against

human breast carcinoma (Gomha et al., 2016, Tao et al., 2018, Gomha et al., 2018).

Derivatives of hydantoin are commonly used for clinical treatment of epilepsy and cardiac arrhythmias (Herrera et al., 2015, Kumkamthornkul et al., 2018), but various additional properties of hydantoins such as anti-inflammatory and antitumor activities have also been noticed (Trišović et al., 2011, Obradović et al., 2013, Marinova et al., 2016, Obradović et al., 2019). One of the most prominent antitumor roles of hydantoin compounds is their significant antiproliferative potential exerted against different types of cancer cells (Cavazzoni et al., 2008, Zuliani et al., 2009, Sekulić Djaković et al., 2015). Certain, hydantoin derivatives have been shown to display strong cytotoxicity in breast cancer cells and induce growth inhibition and apoptosis (Rajic et al., 2006). Moreover, hydantoin core ring variations can be found as a moiety in many drugs used in chemotherapy. Thus selenohydantoins, derivatives of hydantoins in which one of the oxygen atoms is replaced by selenium, express the strong antitumor activity and can be used as effective antioxidants (Ivanenkov et al., 2016).

Beside uncontrolled proliferation, cancer cells display significant migratory and invasive potential which inducing metastasis.

\* Corresponding author.

E-mail address: biljana@bio.bg.ac.rs (B. Božić Nedeljković).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this study.

Peer review under responsibility of King Saud University.



Various factors are involved in cancer cell division, survival, invasion, and dissemination. Tumor-associated inflammation initially promotes tumor growth and stimulates cancer cell survival, but it also enhances metastatic potential of the tumor. Cyclooxygenase 2 (COX-2) is often overexpressed in breast cancer cells (Chow et al., 2008). Although the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are associated with reduced risk of cancer overall and breast cancer in particular (Bowers et al., 2014), their detrimental side effects have been recorded due to low selectivity (Bundred and Barnes, 2005). The usage of new selective COX-2 inhibitors could provide satisfying anti-inflammatory effects and devoid of undesirable effects associated with classical, non-selective NSAIDs. Some recent studies are suggesting a prominent place of selective COX-2 inhibitors in the prevention of different tumors including breast cancer (Mazhar et al., 2005, Takkouche et al. 2008, Regulski et al., 2016).

Extracellular proteinases are essential for metastasis since these enzymes degrade the components of the extracellular matrix and facilitate the disruption of intercellular adhesions, separating individual cells from solid tumor tissue (Herszényi et al., 2014). Among the matrix metalloproteinase family (MMPs), MMP-9 is known to be significantly upregulated in almost all tumor types, including breast cancer (Taguchi et al., 2014). Furthermore, MMP-9 expression positively correlates with cancer stage, grade and prognosis, making it a convenient marker, and a potential therapeutic target for preventing the invasion and metastasis of breast cancer (Roy et al., 2009, Alaseem et al., 2019).

Nitric oxide (NO) has also been considered a tumor-associated molecule. The roles of NO in tumor formation and progression remain controversial. This molecule has an important role in various stages of tumorigenesis such as DNA damage, oncogene activation, inhibition of DNA repair enzymes and tumor suppressor genes, and the modulation of apoptosis and metastasis (Fionda et al., 2016). The different roles of NO in apoptosis, cell cycle, tumor progression, angiogenesis, and metastasis are currently viewed at host tissue and tumor interface since NO was found to be strikingly associated with tumor parenchyma, as well as with the tumor microenvironment (Vannini et al., 2015). The tumor microenvironment includes the cells of the immune system and vascular tissue, and NO appears to be one of the key components of their activity (Artacho-Cordón et al., 2012). Antitumor effects of NO were also recorded in different human and animal tumors (Choudhari et al., 2013, Vahora et al., 2016). iNOS overexpression induces stimulative or inhibitory effects on tumor growth, depending on the microenvironment and tumor type (Mocellin et al., 2007). Overall, the effect of NO depends on the expression level of iNOS, duration and timing of NO delivery, contents of the microenvironment, genetic background, and type of cell, but undoubtedly is involved in tumor progression (Vannini et al., 2015). The increasing data which indicate hydantoin antitumor activity suggest a beneficial role of these compounds in developing of novel chemotherapeutics. Accordingly, the aim of this research was to evaluate the effects of seven 3-(4-substitutedbenzyl)-5-isopropyl-5-phenylhydantoin derivatives (**1–7**, Fig. 1.) on survival ratio, type of cell death, proliferation level, NO production rate, COX-2 and MMP-9 expression profile, and migration/invasion capacity of human breast cancer cell line, MDA-MB-231.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell cultivation and treatment

The human breast cancer cell line MDA-MB-231 line was obtained from American Tissue Culture Collection. These cells were propagated and maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle

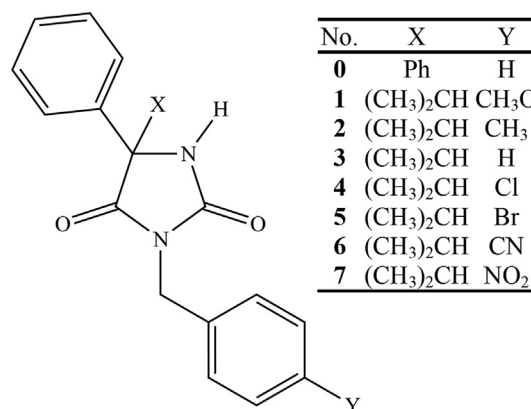


Fig. 1. Structures of investigated compounds.

Medium, SIGMA-ALDRICH, USA) and supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, SIGMA-ALDRICH, USA) and antibiotics (penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). After several passages the cells were trypsinized, seeded in 96-well plate (10<sup>4</sup> cells per well) and cultured in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

After 24 h of incubation, 100 µL of working solution (concentration range: 0.01 µM – 100 µM) was added. Stock solutions of the compounds were made in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the concentration of 1 M and diluted with DMEM to various working concentrations. The concentration of DMSO in the most concentrated working solutions was 0.01% (v/v).

### 2.2. Determination of cell viability

The cells were treated with various doses (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, and 100 µM) of the investigated compounds for 24 h and 72 h. Non-treated cells served as control. After treatment, cell proliferation was determined by the MTT assay (Mosmann, 1983). At the end of the treatment period, 25 µL of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, SIGMA-ALDRICH, USA) solution (5 mg/mL final concentration in PBS (GIBCO, Invitrogen, USA)) was added to each well and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for three hours. The produced formazan was dissolved by overnight incubation in SDS-HCl (10% SDS in 0.01 M HCl) and the percentage of viable cells was calculated as the ratio between the absorbance at each dose of the compounds and the absorbance of the untreated control multiplied by 100 to get a percentage. The absorbance was measured at 550 nm on ELISA (2100C) 96-well plate reader (Rayto, China). We also calculated the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>), defined as the concentration of tested hydantoin derivatives that inhibited cell growth by 50% compared to control. All experiments were performed in triplicate. The IC<sub>50</sub> values were calculated from the dose curves by the software CalcuSyn.

### 2.3. Determination of type of cell death

Apoptosis and necrosis were analyzed by double staining with annexin V-FITC and 7-AAD. Annexin V binds to the cells with exposed phosphatidylserine, whereas 7-AAD labels the cells with membrane damage. Apoptotic cells were detected using the Annexin V-FITC/7-AAD Kit (Apoptosis Detection Kit, Beckman Coulter, USA). Staining was performed according to the manufacturer's instructions and Shouan protocol (Shouan et al., 1998). After the treatment with compounds **0**, **3**, and **4** (Fig. 1.) at a concentration of 1 µM and 10 µM, the cells were collected, washed



in PBS and resuspended in ice cold binding buffer. Ten thousand events were analyzed on FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer (Nyon, Switzerland). The percent of viable (Annexin V<sup>-</sup>7-AAD<sup>-</sup>) cells, early apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>) cells, late apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup>) cells, and necrotic cells (Annexin V<sup>-</sup>7-AAD<sup>+</sup>) cells were evaluated by Flowing Software (<http://www.flooding-software.com/>).

#### 2.4. Caspase activation

The activity of caspases, the enzymes involved in the execution of apoptosis, was measured by flow cytometry after labeling the cells with a cell-permeable FITC-conjugated pan-caspase inhibitor (ApoStat; R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. The increase in green fluorescence (FL1), as a measure of caspase activity, was determined using FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Germany), and the results were expressed as the percentage (%) of cells with active caspases.

#### 2.5. Determination of NO production

The spectrophotometric determination of nitrites - NO<sub>2</sub> (an indicator of the nitric oxide level) was performed by using the Griess method (Griess, 1879). Griess reaction is based on the coupling of NO-generated diazonium ion with *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine where a chromophoric azo product is formed with an absorption maximum at 550 nm and measured by ELISA microplate reader. The concentrations of nitrites were calculated from the appropriate standard curves for nitrites.

#### 2.6. Cell migration

The cell migration capacity was determined by measuring the ability of cells to pass the pores of polycarbonate membranes (pore size 8 μm; Greiner Bio-One, Switzerland) at the bottom of transwell chambers. The migration test was performed according to the protocol described by Chen (Chen, 2005). The cells were exposed to 1 μM and 10 μM concentration of compounds **0**, **3**, and **4** for 24 h and 72 h, respectively. The control cells were cultured only in DMEM. After the treatments, all groups of treated cells were trypsinized and placed in the upper chambers at a density of 1 × 10<sup>5</sup> cells/well in 500 μL of DMEM with 10% FBS. The lower chambers contained 750 μL of DMEM supplemented with 10% FBS. After 6 h of incubation at 37 °C, the cells from the upper surface of the membrane were completely removed with gentle swabbing. The remaining migrated cells were fixed for 20 min at room temperature in 4% paraformaldehyde and stained with 0.1% crystal violet in 200 mM 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid (pH 6.0) for 10 min. Absorbance was measured by a microplate reader at 595 nm. The migration index was calculated as the ratio of absorbance of the treated cells divided by the absorbance of the control cells and multiplied by 100 to give the percentage.

#### 2.7. Quantitative PCR (qPCR)

Total cell RNA was isolated from cells using TRIzol reagent according to Chomczynski and Sacchi protocol (Chomczynski and Sacchi, 1987). The purity and concentrations of obtained RNA were evaluated spectrophotometrically by measuring solution absorbance at 260 and 280 nm. The A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio of the samples was ≥ 1.8. Extracted RNA (2 μg) from each sample were reversely transcribed using Superscript II RT enzyme (Invitrogen) in a total reaction volume of 20 μL. The obtained complementary DNA (cDNA) was PCR-amplified and the final 20 μL reaction volume contained 0.5 μM primers, 1 × SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 2 μL of the cDNA. cDNA amplification

was performed by qRT-PCR method (quantitative real-time PCR) in 7500 Real Time System (Thermo Fisher Scientific) using the primer pairs (Obradović et al., 2019).

The qPCR reaction program was set in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems): activation of the polymerase for 3 min at 95 °C, 40 cycles of 15 sec at 95 °C and 60 sec at 55 °C. Relative expression value was calculated according to formula  $\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta\Delta CT$  where  $\Delta CT$  refers to the difference between the cycle threshold values (CT) obtained for the target gene in treatment sample and non-treated control, respectively, and  $\Delta\Delta CT$  represents the difference of  $\beta$ -actin gene expression levels (endogenous control) (Livak and Schmittgen, 2001). The negative control samples (without cDNA) were also amplified in qPCR reaction to confirm that the contamination with genomic DNA was in the acceptable range (Cheeseman et al., 2012). The results were expressed as the percentage of the change compared to control values.

#### 2.8. Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SE. Statistical evaluation was calculated by Paired Sample T-Test, SPSS. The magnitude of the correlation between variables was done using an SPSS (Chicago, IL) statistical software package (SPSS for Windows, ver. 17). For all comparisons  $p < 0.05$  control vs. treatment was considered significant. The data are the result of three independent (individual) experiments, performed in triplicate for each dose.

### 3. Results

#### 3.1. Antiproliferative potential of isopropyl-phenyl hydantoins

At our previous research (Trišović et al., 2011, Obradović et al., 2013) compound **3**-benzyl-5,5-diphenylhydantoins, marked as compound **0**, showed the strongest activity in the previously tested hydantoin derivatives series. Accordingly, this compound was used for comparison of the effects with the new series of isopropyl-phenyl hydantoins. In Tables 1 and 2 antiproliferative effects of these compounds at various concentrations on the human breast cancer cell line, MDA-MB-231, after 24 and 72 h of incubation are presented. All compounds showed significant antiproliferative activities on MDA-MB-231 cells compared to non-treated cells. All compounds showed considerable dose- and time-dependent inhibition of MDA-MB-231 cell proliferation. Antiproliferative activity of compound **3** was the highest after 24 h treatment and compound **4** showed the strongest effects after 72 h.

Since the compounds used in this study show significant antiproliferative effects on MDA-MB-231 cells, these molecules should be further investigated for the mechanisms of their antiproliferative action. The results of the antiproliferative activity of all investigated compounds on MDA-MB-231 cells were expressed as IC<sub>50</sub> values and presented in Table 3. After 72 h treatment, all examined compounds showed stronger antiproliferative activity compared to short-term (24 h) treatment. After long-term treatment, all compounds showed higher antiproliferative potential compared to compound **0**, from the previous study, with IC<sub>50</sub> values < 10 μM, except for the compound **1**.

#### 3.2. Determination of cell apoptosis by Annexin V-FITC/7-AAD staining

The type of cell death induced by treatment with investigated hydantoin derivatives was determined by flow cytometric analysis of treated cells stained with Annexin V FITC and 7-AAD. The strongest antiproliferative effect has been exerted by compound **3** and **4**, and the effect was significantly stronger compared to compound **0**,

**Table 1**

Effect of investigated compounds on proliferation index of MDA-MB-231 cells expressed as percentage of proliferation level after 24 h compared to non-treated control cells (100%).

No	0.01 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
0	85 $\pm$ 3.8 *	75 $\pm$ 3.6*	72 $\pm$ 1.1 *	69 $\pm$ 2.9 *	53 $\pm$ 1.8 *	42 $\pm$ 2.3 *
1	82 $\pm$ 2.8 *	78 $\pm$ 2.0 *	75 $\pm$ 1.0 *	68 $\pm$ 2.6 *	73 $\pm$ 4.8 *	57 $\pm$ 4.3 *
2	84 $\pm$ 2.3 *	70 $\pm$ 5.1 *	75 $\pm$ 4.1 *	70 $\pm$ 4.2 *	57 $\pm$ 6.0 *	53 $\pm$ 6.9 *
3	81 $\pm$ 1.2 *	68 $\pm$ 3.2 *	67 $\pm$ 2.6 *	65 $\pm$ 4.9 *	56 $\pm$ 1.2 *	40 $\pm$ 2.1 *
4	83 $\pm$ 1.8 *	75 $\pm$ 2.4 *	60 $\pm$ 4.6 *	58 $\pm$ 4.8 *	46 $\pm$ 2.4 *	41 $\pm$ 3.3 *
5	78 $\pm$ 2.2 *	68 $\pm$ 2.8 *	70 $\pm$ 3.5 *	67 $\pm$ 3.3 *	61 $\pm$ 2.1 *	56 $\pm$ 2.4 *
6	87 $\pm$ 1.5 *	77 $\pm$ 3.7 *	66 $\pm$ 2.4 *	64 $\pm$ 3.6 *	53 $\pm$ 4.8 *	45 $\pm$ 3.2 *
7	79 $\pm$ 2.0 *	70 $\pm$ 2.7 *	76 $\pm$ 2.4 *	71 $\pm$ 1.4 *	56 $\pm$ 3.0 *	44 $\pm$ 4.6 *

The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\*p < 0.05 different concentrations of compound vs. control)

**Table 2**

Effect of investigated compounds on proliferation index of MDA-MB-231 cells expressed as percentage of proliferation level after 72 h compared to non-treated control cells (100%).

No	0.01 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
0	79 $\pm$ 1.2 *	65 $\pm$ 3.3 *	58 $\pm$ 3.0 *	52 $\pm$ 1.7 *	50 $\pm$ 3.9 *	39 $\pm$ 2.8 *
1	71 $\pm$ 4.2 *	70 $\pm$ 3.3 *	60 $\pm$ 4.0 *	50 $\pm$ 2.7 *	49 $\pm$ 2.8 *	55 $\pm$ 1.8 *
2	63 $\pm$ 3.6 *	60 $\pm$ 1.2 *	59 $\pm$ 3.7 *	56 $\pm$ 4.2 *	45 $\pm$ 1.3 *	40 $\pm$ 2.7 *
3	70 $\pm$ 1.9 *	65 $\pm$ 1.3 *	55 $\pm$ 4.30 *	50 $\pm$ 1.1 *	45 $\pm$ 3.1 *	32 $\pm$ 5.8 *
4	60 $\pm$ 3.7 *	57 $\pm$ 3.3 *	55 $\pm$ 2.8 *	49 $\pm$ 1.7 *	37 $\pm$ 3.1 *	31 $\pm$ 2.5 *
5	59 $\pm$ 2.0 *	50 $\pm$ 2.5 *	46 $\pm$ 1.8 *	55 $\pm$ 1.6 *	40 $\pm$ 2.1 *	38 $\pm$ 3.7 *
6	65 $\pm$ 9.9 *	55 $\pm$ 0.4 *	43 $\pm$ 4.9 *	53 $\pm$ 8.7 *	42 $\pm$ 4.7 *	35 $\pm$ 6.0 *
7	68 $\pm$ 3.2 *	63 $\pm$ 3.8 *	53 $\pm$ 4.2 *	45 $\pm$ 8.4 *	43 $\pm$ 4.3 *	40 $\pm$ 4.9 *

The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\*p < 0.05 different concentrations of compound vs. control)

**Table 3**

The half-maximal inhibitory concentration IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M) of investigated compounds against MDA-MB-231 cells proliferation.

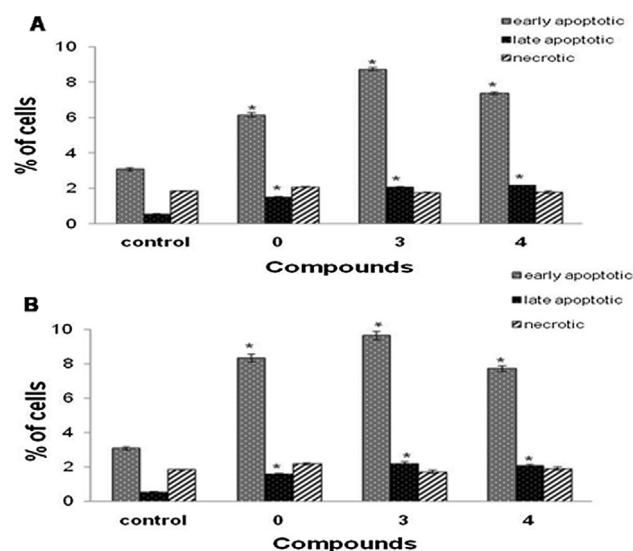
No.	24 h	72 h
0	87 $\pm$ 0.2	14 $\pm$ 0.03
1	> 100	78 $\pm$ 0.1
2	> 100	10 $\pm$ 0.1
3	74 $\pm$ 0.1	6 $\pm$ 0.1
4	21 $\pm$ 0.2	0.90 $\pm$ 0.1
5	> 100	1.40 $\pm$ 0.04
6	> 100	1.20 $\pm$ 0.1
7	> 100	3.70 $\pm$ 0.1

The cells treated with various concentrations of compounds during a 24 and 72 h. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate.

the selected molecule from the previous study (Trišović et al., 2011). Subsequently, compounds, **3** and **4**, their structure was shown in Fig. 1, were selected for further research and determining of the antitumor mechanisms, in concentrations of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M where the antiproliferative effect is clearly evident. MDA-MB-231 cells were incubated during 24 and 72 h. At both examined concentrations, all three compounds induced a statistically significant increase of apoptosis rate in MDA-MB-231 cells, after 24 h treatment, (shown in Fig. 2), and 72 h treatment (shown on Fig. 3). The time- and dose-dependent effects of the compounds are respectively exhibited.

### 3.3. Determination of caspase activation

MDA-MB-231 cells were treated with 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of selected derivatives **0**, **3**, and **4** during 24 and 72 h. At both examined concentrations, all three compounds have stimulated the activation of the apoptosis executing enzymes, caspases, as demonstrated by an increase in Apostat fluorescence signal. The data are shown in Figs. 4 and 5 represent caspases activation.

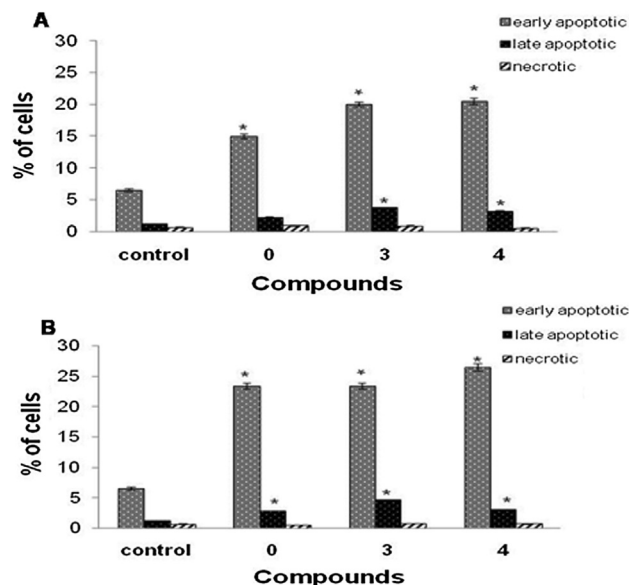


**Fig. 2.** Flow cytometric analysis of Annexin V-FITC/7-AAD stained MDA-MB-231 cells for 24 h with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations 1  $\mu$ M (A) and 10  $\mu$ M (B). The percentages of early apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>, lower right quadrant), late apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup>, upper right quadrant) and necrotic cells (Annexin V<sup>-</sup>7-AAD<sup>+</sup>, upper left quadrant) in non-treated and treated cells are indicated on dot plots). The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\*p < 0.05 different concentrations of compound vs. control).

### 3.4. Determination of NO production by Griess assay

The data shown in Fig. 6 represent nitrite concentrations in supernatants of MDA-MB-231 cells treated with 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of selected compounds **0**, **3**, and **4** after 24 and 72 h. All three compounds showed a significant increase in production of NO by MDA-MB-231 cells measured by nitrite concentrations compared to NO values in supernatants of non-treated cells. The strongest activity has been shown on compound **3** after 24 h of





**Fig. 3.** Flow cytometric analysis of Annexin V-FITC/7-AAD stained MDA-MB-231 cells for 72 h exposure with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations 1  $\mu$ M (A) and 10  $\mu$ M (B). The percentages of early apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>, lower right quadrant), late apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup>, upper right quadrant) and necrotic cells (Annexin V<sup>-</sup>7-AAD<sup>+</sup>, upper left quadrant) in untreated and treated cells are indicated on dot plots. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).

treatment, while after 72 h treatment compound **4** showed the strongest effect.

### 3.5. Expression of the inducible nitrite oxide synthase (iNOS) gene

In Fig. 7, the changes in the iNOS gene expression profile induced by synthesized hydantoin compounds **0**, **3**, and **4** are presented. The results show that long-term treatment (72 h) with all three hydantoin derivatives at concentrations of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M caused statistically significant increase in gene expression compared to non-treated cells.

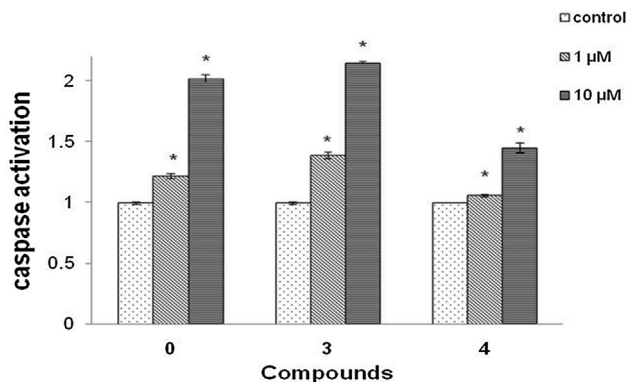
### 3.6. Migration capacity (Boyden chamber assay)

To examine the effects of hydantoin derivatives on the migration capacity of human breast cancer cell line MDA-MB-231, the transwell migration assay was performed. The results presented in Fig. 8 show a significant decrease in migration index of MDA-MB-231 cells exposed to compounds **0**, **3**, and **4** at a concentration of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M for 24 and 72 h, respectively, compared to the non-treated cells. Long-term exposure to compounds **0**, **3**, and **4** induced stronger reduction of migration index compared to short-term exposure suggesting a time-dependent effect.

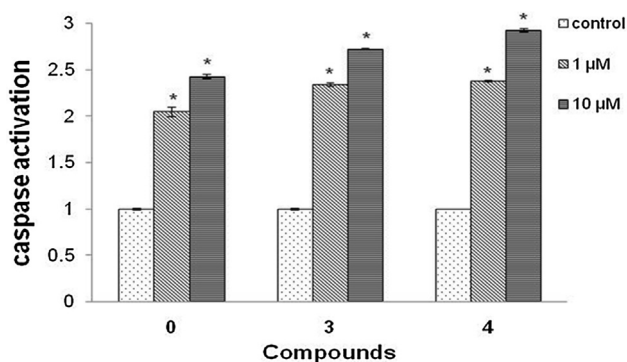
### 3.7. Expression of genes involved in invasion (COX-2 and MMP-9)

The rate of gene expression is directly connected with the levels of protein synthesis important for regulation of migration/invasion of breast cancer cells. The gene expression levels were determined by qRT PCR method using the fluorescently labeled Syber Green dye that generates the signal and quantifies the amount of expressed mRNA (mRNA). The expression of the genes was determined only after long-term treatment (72 h).

The effects of synthesized derivatives **0**, **3**, and **4** in concentrations of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M on the change in expression of COX-2 gene



**Fig. 4.** The antitumor activity of investigated compounds against MDA-MB-231 cells *in vitro* after 24 h. MDA-MB-231 cell line were treated with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M during 24 h exposure compared to non-treated control cell (100%). The cell viability was determined using caspase activation by flow cytometry. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).



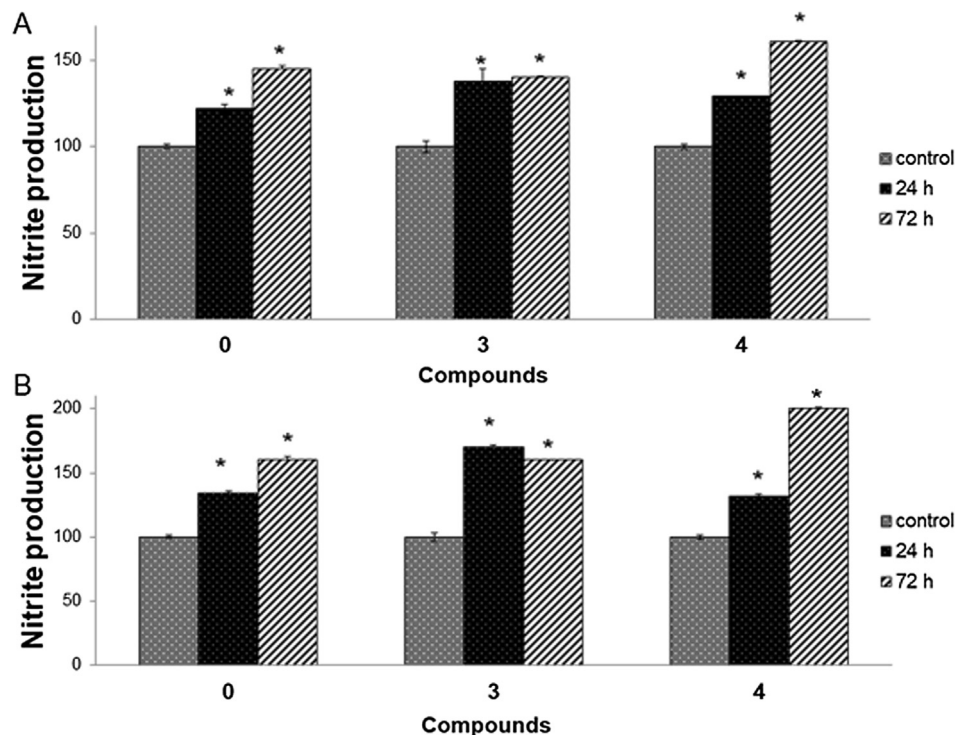
**Fig. 5.** The antitumor activity of investigated compounds against MDA-MB-231 cells *in vitro* after 72 h. MDA-MB-231 cell line were treated with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M during 72 h exposure compared to non-treated control cell (100%). The cell viability was determined using caspase activation by flow cytometry. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).

in MDA-MB-231 cells after long-term exposure (72 h) were shown in Fig. 9A. The results show that the treatment with these three derivatives at concentrations of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M caused statistically significant reduction in COX-2 gene expression compared to control cells.

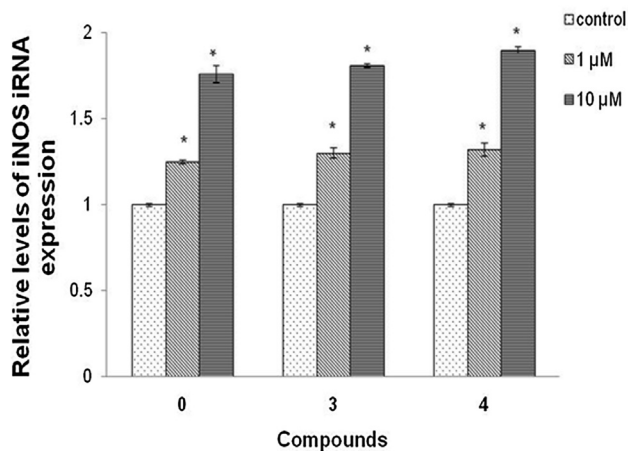
Moreover, the results obtained from expression of MMP-9, which plays an important role in the progression of breast cancer cells (Duffy et al., 2000), indicate that tested compounds can affect expression of the corresponding gene. The changes induced by compounds **0**, **3**, and **4** in the level of MMP-9 gene expression compared to control cells are shown in Fig. 9B. The results show that long-term treatment with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations of 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M induced a statistically significant reduction in the expression of the MMP-9 gene compared to control cells.

## 4. Discussion

Despite various new therapeutic approaches, chemotherapy remains the most common form of breast cancer treatment, with considerable limitations regarding excessive toxicity of frequently used drugs and increasing resistance of cancer cells. Many studies have implied the correlation between hydantoin structure and



**Fig. 6.** Effect of investigated compounds on NO production in the MDA-MB-231 cells during 24 h and 72 h exposure compared to non-treated control cell (100%). The cells were treated with compounds **0**, **3**, and **4** at concentrations 1  $\mu$ M (A) and 10  $\mu$ M (B). The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).



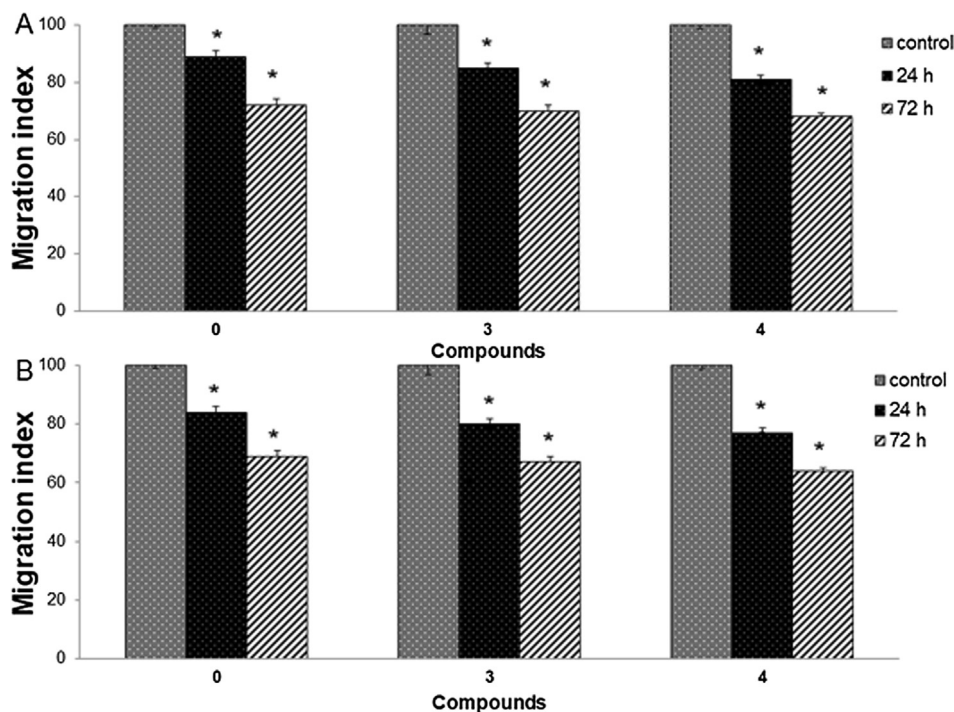
**Fig. 7.** Relative levels of iNOS mRNA expression following treatment with 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of investigated compounds **0**, **3**, and **4** in MDA-MB-231 cells after 72 h. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).

their various biological effects, so growing number of experiments are focused on the synthesis of novel hydantoin derivatives with the aim of reinforcing their present antitumor potential (Jansen et al., 2003, Kumar et al., 2017). Aromatic units at C5 position are important structural property for interactions with biological structures and studies have shown that 5-benzyliden-hydantoin derivatives can function as 4-anilinoquinazolin bioisosters already approved for the treatment of lung cancer (Carmi et al., 2006, Cavazzoni et al., 2008). The significant antiproliferative effect of certain diazaspiro-bicyclo hydantoin derivatives on human leukemia cells are also indicated (Kumar et al., 2009).

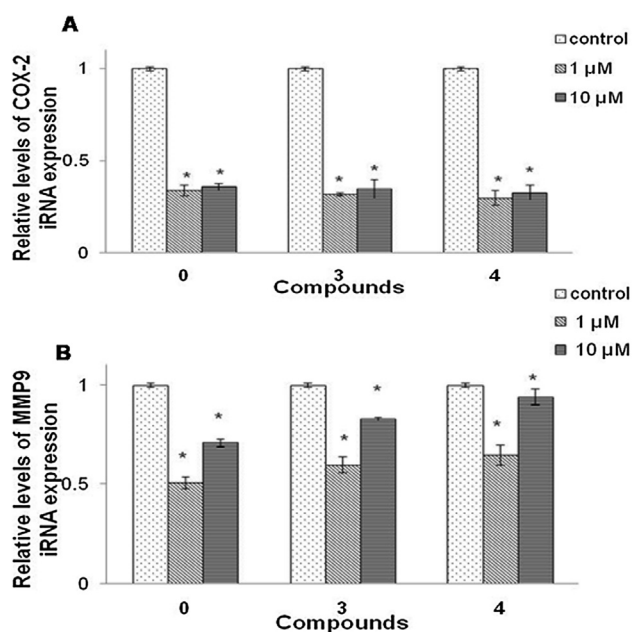
Tumor cells evade apoptosis, excessively proliferate and survive under hypoxic conditions, acquiring the resistance to therapeutic

agents (Liang et al., 2018). All examined hydantoin derivatives in this study exerted antiproliferative activities in dose-dependent manner until the concentration of 10  $\mu$ M where the plateau was reached. The compound **4** with chloro-substituent has shown the strongest antiproliferative effect which is in accordance with literature data (Sekulić Djaković et al., 2015). All investigated derivatives have shown satisfying biocompatibility (Obradović et al., 2019), implying their safe use as potential drugs for treatment of breast cancer. Apoptosis-inducing agents are expected to be effective antitumor drugs since apoptosis is an efficient protective mechanism against tumor development that remove genetically damaged cells before they undergo clonal expansion (Hassan et al., 2014). The selected derivatives (**0**, **3** and **4**) at both used concentrations (1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) induced statistically significant increase of apoptosis rate and caspase activation in MDA-MB-231 cells in time-dependent manner. These results imply that some of antitumor mechanisms of these derivatives is based on triggering of apoptosis and inhibiting the division of breast cancer cells.

Some previous studies have demonstrated that NO can induce cell death by affecting apoptosis-related mitochondrial proteins (Messmer et al., 1996, Snyder et al., 2009). The data acquired in our study suggest that significant proapoptotic levels in MDA-MB-231 cells could be mediated via increased NO production induced by examined derivatives which could trigger the components of intrinsic proapoptotic pathways. Besides, excessive generation of NO promotes formation of extremely aggressive peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which is one of the key molecules for bimodal effects of NO in physiological and pathological conditions (Pacher et al., 2007). Our results suggest that in this study investigated hydantoin compounds are potent inducers of apoptosis of breast cancer cell line which may correspond to NO-generating potential of these molecules. Elevated levels of NO have also been shown to inhibit metastasis in different tumor type which could imply that NO generation has beneficial role in antitumor therapies (Aranda et al., 2012). Our results indicate increase levels of NO in



**Fig. 8.** Effect of exposure to investigated compounds **0**, **3**, and **4** on migration index of MDA-MB-231 cells. The cells were treated at concentrations of 1  $\mu\text{M}$  (A) and 10 (B)  $\mu\text{M}$  during a 24 h and 72 h exposure. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).



**Fig. 9.** Relative levels of COX-2 (A) and MMP-9 (B) iRNA expression following treatment with 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  investigated compounds **0**, **3**, and **4** in MDA-MB-231 cells after 72 h. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE from three independent experiments performed in triplicate. (\* $p < 0.05$  different concentrations of compound vs. control).

MDA-MB-231 cells treated by investigated hydantoin derivatives. One of the key genes involved in tumorigenesis is iNOS that generates NO in significant amounts in breast cancer cell (Choudhari et al., 2013). A lot of antitumor agents have been aimed to trigger iNOS gene expression in order to inhibit growth and induce apoptosis of metastatic tumor cells (Vannini et al., 2015). The hydantoin

derivatives tested in our study have increased the expression level for almost 100% compared to control levels, which explains the high concentration of NO recorded in the study. These data indicate that hydantoin derivatives are potential triggers of NO production which could contribute to partly explain their antiproliferative and proapoptotic properties. The results show that long-term treatment (72 h) of MDA-MB-231 cells with selected hydantoin derivatives (**0**, **3**, and **4**) caused statistically significant increase of iNOS gene expression compared to non-treated cells indicating that high concentration of NO may be caused by *de novo* synthesis of these signal molecule.

The tested hydantoin derivatives in our study reduced the migration capacity of MDA-MB-231 cells. Based on these data, we proposed that one of the mechanisms by which these compounds inhibit migration of human breast cancer cells is elevating the bioavailability of NO. This molecule is involved in the regulation of cell adhesion molecules, presumably the integrins, important for cell motility (Roberts et al., 2008). Previously mentioned elevation in NO production could indicate the role of NO in migration mechanisms of this cell type. Although the majority of studies have reported invasion-promoting effects of NO in various cell types, there are several studies which reported antimigratory and antiproliferative effects of NO (Aranda et al., 2012). Reduction in migration capacity could also be correlated with increased expression of the inducible isoform of cyclooxygenase, COX-2 gene detected in the study. Majumder and colleagues have implied that elevated COX-2 expression level had to promote effect on migration capacity of breast cancer cells (Majumder et al., 2016). In our study reduced migration index could be caused by a decrease in COX-2 expression level recorded in the treatments. The compound **4** with chloro-substituent has shown the strongest reduction of the migratory potential of these cells. However, these data suggest that tested hydantoin derivatives exert significant antimigratory effects on breast cancer cells making them promising antitumor agents.



Matrix metalloproteinases (MMPs), as regulators of the tumor microenvironment, are also important contributors to cancer progression, representing the crucial enzymes in tumor cell invasion by leading to epithelial-mesenchymal transition. MMP-9 is strongly associated with aggressive and metastatic breast cancer (Mehner et al., 2014). MMP-9 and other MMPs as biomarkers of breast cancer stage are used in the monitoring of therapeutic responses on different individuals to estimate the efficiency of particular chemotherapeutic regimen (Said et al., 2014). The results of our study have shown that long-term treatment (72 h) of MDA-MB-231 cells with selected compounds (**0**, **3**, and **4**) induced statistically significant reduction of expression level of the MMP-9 gene compared to control cells, suggesting that these compounds may reduce invasion capacity of MDA-MB-231 cells by downregulation of MMP-9 expression.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs NSAIDs are the most used medications against inflammation, but besides their benefits, serious side effects prompted the development for more selective COX-2 inhibitors such as Coxibs and NO-releasing NSAIDs (Arun and Goss, 2004; Tołoczko-Iwaniuk et al., 2019). Inflammatory molecules and factors involved in the wound healing process are considered the key regulatory signals in numerous models of tumorigenesis (Coussens and Werb, 2002; Philip et al., 2004). COX-2 has been shown to represent an indicative link between inflammation and progression of many types of cancer, including breast cancer, and a lot of contemporary chemotherapies are aimed at down-regulation of COX-2 activity (Koki et al., 2002; Hashemi et al., 2019). Literature data suggest that COX-inhibitors can reduce tumor invasion, representing reinforcement to standard cytotoxic therapy (Liu et al., 2015). Certain hydantoin compounds such as 5,5-diarylhydantoin derivatives have shown more selective inhibition of COX-2 enzyme (Zarghi and Arfaei, 2011). Our results show that compounds **0**, **3**, and **4** caused a statistically significant reduction in COX-2 gene expression compared to non-treated cells, which additionally may promote one of the possible modes of their antitumor action (Mehner et al., 2014). The comparative studies with NSAID selective inhibitors are yet to be done, but we can suggest that these novel hydantoin derivatives are promising agents in reducing prostaglandin production in breast cancer cells MDA-MB-231.

## 5. Conclusions

The investigated hydantoin derivatives have shown significant antitumor activity against MDA-MB-231 cells measured by different parameters of cell physiology. Almost all tested compounds exerted significant antiproliferative and proapoptotic effects in a dose- and time-dependent manner as one of the most important antitumor mechanisms. Also, these compounds have reduced cell migration and invasion capacity, and shown significant selectivity on proliferation index regarding non-malignant cells. Thus, our study exhibited that investigated 3-(4-substituted benzy)-5-iso propyl-5-phenylhydantoin derivatives, owing to their pleiotropic effects, had the potential for the treatment of breast cancer and can be considered as a promising novel tumor therapy in humans, whereby compounds **3** and **4** being particularly prominent and which remains to be further explored.

## Acknowledgments

This investigation was supported by the Ministry of Education and Science, and Technological Development of the Republic of Serbia, grants III41010, 175033, and 173041.

## Disclosure of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

- Alaseem, A., Alhazzani, K., Dondapati, P., Alobid, S., Bishayee, A., Rathinavelu, A., 2019. Matrix Metalloproteinases: a challenging paradigm of cancer management. *Semin. Cancer Biol.* 56, 100–115.
- Aranda, E., Lopez-Pedraza, C., De La Haba-Rodriguez, J.R., Rodriguez-Ariza, A., 2012. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. *Curr. Mol. Med.* 12, 50–67.
- Artacho-Cordón, A., Artacho-Cordón, F., Ríos-Arrabal, S., Calvente, I., Núñez, M.I., 2012. Tumor microenvironment and breast cancer progression: a complex scenario. *Cancer Biol. Ther.* 13, 14–24.
- Arun, B., Goss, P., 2004. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin. Oncol.* 31, 22–29.
- Bowers, L.W., Maximo, I.X.F., Brenner, A.J., Beeram, M., Hursting, S.D., Price, R.S., Tekmal, R.R., Jolly, C.A., deGraffenried, L.A., 2014. NSAID use reduces breast cancer recurrence in overweight and obese women: role of prostaglandin-aromatase interactions. *Cancer Res.* 74, 4446–4457.
- Bundred, N.J., Barnes, N.L., 2005. Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer. *Br. J. Cancer* 93 (Suppl 1), S10–S15.
- Carmi, C., Cavazzoni, A., Zuliani, V., Lodola, A., Bordin, F., Plazzi, P.V., Mor, M., 2006. 5-Benzylidene-hydantoin as new EGFR inhibitors with anti-proliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4021–4025.
- Cavazzoni, A., Alferi, R.R., Carmi, C., Zuliani, V., Galetti, M., Fumarola, C., Frazzi, R., Bonelli, M., Bordin, F., Lodola, A., Mor, M., Petronini, P.G., 2008. Dual mechanisms of action of the 5-benzylidene-hydantoin UPR1024 on lung cancer cell lines. *Molec. Cell. Therap.* 7, 361–370.
- Cheeseman, K., Rouleau, E., Vannier, A., Thomas, A., Briaux, A., Lefol, C., et al., 2012. A diagnostic genetic test for the physical mapping of germline rearrangements in the susceptibility breast cancer genes BRCA1 and BRCA2. *Hum. Mutat.* 33, 998–1009.
- Chen, H.C., 2005. Boyden chamber assay. *Methods. Mol. Biol.* 294, 15–22.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Choudhari, S.K., Chaudhary, M., Bagde, S., Gadbaile, A.R., Joshi, V., 2013. Nitric oxide and cancer: a review. *World. J. Surg. Oncol.* 11, 118.
- Chow, L.W., Yip, A.Y., Loo, W.T., Lam, C.K., Toi, M., 2008. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 111, 13–17.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Duffy, M.J., Maguire, T.M., Hill, A., McDermott, E., O'Higgins, N., 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast. Cancer Res.* 2, 252–257.
- Fionda, C., Abruzzese, M.P., Santoni, A., Cippitelli, M., 2016. Immunoregulatory and Effector Activities of Nitric Oxide and Reactive Nitrogen Species in Cancer. *Curr. Med. Chem.* 23, 2618–2636.
- Gomha, S., Abdelhamid, A., Abdelrehem, N., Kandeel, S., 2016. Efficient Synthesis of New Benzofuran-based Thiazoles and Investigation of their Cytotoxic Activity Against Human Breast Carcinoma Cell Lines. *J. Heterocyclic Chem.* 55, 995–1001.
- Gomha, S., Badreyb, M., Edreesc, M., 2018. Heterocyclisation of 2,5-diacetyl-3,4-disubstituted-thieno[2,3-b]thiophene bis-thiosemicarbazones leading to bis-thiazoles and bis-1,3,4-thiadiazoles as anti-breast cancer agents. *J. Chem. Res.* 40, 120–125.
- Griess, P., 1879. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12, 426–428.
- Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B., Mortezaee, K., 2019. Cyclooxygenase-2 in cancer: a review. *J. Cell. Physiol.* 234, 5683–5699.
- Hassan, M., Watari, H., Abu Almaaty, A., Ohba, Y., Sakuragi, N., 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* 2014, 150845.
- Herrera, J.A., Ward, C.S., Pitcher, M.R., Percy, A.K., Skinner, S., Kaufmann, W.E., Glaze, D.G., Wehrens, X.H., Neul, J.L., 2015. Treatment of cardiac arrhythmias in a mouse model of Rett syndrome with Na<sup>+</sup>-channel-blocking antiepileptic drugs. *Dis. Model. Mech.* 8, 363–371.
- Herszényi, L., Barabás, L., Hritz, I., István, G., Tulassay, Z., 2014. Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression. *World. J. Gastroenterol.* 20, 13246–13257.
- Ivanenkov, Y.A., Veselov, M.S., Rezekin, I.G., Skvortsov, D.A., Sandulenko, Y.B., Polyakova, M.V., Bezrukov, D.S., Vasilevsky, S.V., Kukushkin, M.E., Moiseeva, A. A., 2016. Synthesis, isomerization and biological activity of novel 2-selenohydantoin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 802–811.
- Jansen, M., Potschka, H., Brandt, C., Löscher, W., Dannhardt, G., 2003. Hydantoin-substituted 4,6-dichloroindole-2-carboxylic acids as ligands with high affinity for the glycine binding site of the NMDA receptor. *J. Med. Chem.* 46, 64–73.
- Koki, A.T., Leahy, K.M., Harmon, J.M., Masferrer, J.L., 2002. Cyclooxygenase-2 and cancer. In: Harris, R.E. (Ed.), *COX-2 Blockade in Cancer Prevention and Therapy*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 185–203.
- Kumar, C.S.A., Prasad, S.B., Vinaya, K., Chandrappa, S., Thimmegowda, N.R., Ranganatha, S.R., Swarup, S., Rangappa, K.S., 2009. Synthesis and anti-

- proliferative activity of substituted diazaspiro hydantoins: a structure-activity relationship study. *Invest. New Drugs*. 27, 131–139.
- Kumar, C.S.A., Veeresh, B., Ramesha, K.C., Raj, C.S.A., Mahadevaiah, K.M., Prasad, S.B. B., 2017. Synthesis and Evaluation of Novel Diazaspiro Hydantoins as Potential Anticonvulsants. *Cent. Nerv. Syst. Agents. Med. Chem.* 17, 201–208.
- Kumkamthornkul, P., Udnaen, S., Tansit, T., Tuchinda, P., Srinoulprasert, Y., 2018. Evaluation of lymphocyte transformation test and cytokine detection assay to identify phenytoin and carbamazepine provoked DRESS or SJS/TEN in epilepsy patients. *Int. Immunopharmacol.* 63, 204–210.
- Liang, Y., Chen, H., Ji, L., Du, J., Xie, X., Li, X., Lou, Y., 2018. Talin 2 regulates breast cancer cell migration and invasion by apoptosis. *Oncol. Lett.* 16, 285–293.
- Liu, B., Qu, L., Yan, S., 2015. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer. Cell. Int.* 15, 106.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Method.* 25, 402–408.
- Majumder, M., Xin, X., Liu, L., Tutunea-Fatan, E., Rodriguez-Torres, M., Vincent, K., Postovit, L.M., Hess, D., Lala, P.K., 2016. COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis. *Stem Cells*. 34, 2290–2305.
- Marinova, P., Marinov, M., Kazakova, M., Feodorova, Y., Slavchev, A., Blazheva, D., Georgiev, D., Penchev, P., Sarafin, V., Stoyanov, N., 2016. Study on the Synthesis, Characterization and Bioactivities of 3-Methyl-9'-fluorenespiro-5-hydantoin. *Acta. Chim. Slov.* 63, 26–32.
- Mazhar, D., Gillmore, R., Waxman, J., 2005. COX and cancer. *Q. J. Med.* 98, 711–718.
- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D.C., Radisky, E.S., 2014. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget* 5, 2736–2749.
- Messmer, U.K., Reed, U.K., Brune, B., 1996. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 20192–20197.
- Mocellin, S., Bronte, V., Nitti, D., 2007. Nitric oxide, a double-edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med. Res. Rev.* 27, 317–352.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65, 55–63.
- Murad, H., Hawat, M., Ekhtiar, A., Aljapawe, A., Abbas, A., Darwish, H., Sbenati, O., Ghannam, A., 2016. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *Laurencia papillosa*. *Cancer. Cell. Int.* 16, 39.
- Obradović, A., Matić, M., Ogrnjanović, B., Vuković, N., Vukelić, M., Đurđević, P., Ušćumlić, G., Božić, B., Božić Nedeljković, B., 2019. Anti-Tumor Mechanisms of Novel 3-(4-Substituted Benzyl)-5-Isopropyl-5-Phenylhydantoin Derivatives on Human Colon Cancer Cell Line. *Anticancer. Agents. Med. Chem.* doi:10.2174/1871520619666190425180610
- Obradović, A., Žižić, J., Trišović, N., Božić, B., Ušćumlić, G., Božić, B., Marković, S., 2013. Evaluation of anti-oxidative effects of twelve 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins on human colon cancer cell line HCT-116. *Turk. J. Biol.* 37, 741–747.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- Philip, M., Rowley, D.A., Schreiber, H., 2004. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer. Biol.* 14, 433–439.
- Rajić, Z., Zorc, B., Raic-Malic, S., Ester, K., Kralj, M., Pavelic, K., Balzarini, J., De Clercq, E., Mintas, M., 2006. Hydantoin derivative of L- and D-amino acids: synthesis and evaluation of their antiviral and antitumoral activity. *Molecule*. 11, 837–848.
- Regulska, M., Regulska, K., Prukała, W., Piotrowska, H., Stanisz, B., Murias, M., 2016. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. *Drug. Discov. Today*. 21, 598–615.
- Roberts, W., Riba, R., Homer-Vanniasinkam, S., Farnedale, R.W., Naseem, K.M., 2008. Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen. *J. Thromb. Haemost.* 6, 2175–2185.
- Roy, R., Yang, J., Moses, M.A., 2009. Matrix Metalloproteinases as Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 5287–5297.
- Said, A.H., Raufman, J.P., Xie, G., 2014. The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers*. 6, 366–375.
- Sekulić Djaković, T.Lj., Smoliński, A., Trišović, N.P., Ušćumlić, G.S., Božić, B.Dj., 2015. Chemometric Study of the Antiproliferative Activity of Some New Hydantoin Derivatives: Assessment of Activity and Chromatographic Lipophilicity Data. *J. Braz. Chem. Soc.* 26, 1379–1386.
- Shounan, Y., Feng, X., O'Connell, P.J., 1998. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*. 217, 61–70.
- Snyder, C.M., Shroff, E.H., Liu, J., Chandel, N.S., 2009. Nitric Oxide Induces Cell Death by Regulating Anti-Apoptotic BCL-2 Family Members. *PLoS ONE* 4, e7059.
- Taguchi, A., Kawana, K., Tomio, K., Yamashita, A., Isobe, Y., Nagasaka, K., Koga, K., Inoue, T., Nishida, H., Kojima, S., Adachi, K., Matsumoto, Y., Arimoto, T., Wada-Hirakie, O., Oda, K., Kang, J.X., Arai, H., Arita, M., Osuga, Y., Fujii, T., 2014. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 9, e89605.
- Takkouche, B., Regueira-Méndez, C., Etmnan, M., 2008. Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer. Inst.* 100, 1439–1447.
- Tao, Z., Gomha, S., Badrey, M., El-Idreesy, T., Eldebss, T., 2018. Novel 4-Heteroaryl-antipyridines: Synthesis, Molecular Docking, and Evaluation as Potential Anti-breast Cancer Agents. *J. Heterocyclic Chem.* 55, 2408–2416.
- Toloczko-Iwaniuk, N., Dziemiańczyk-Pakieła, D., Nowaszewska, B.K., Celińska-Janowicz, K., Miltik, W., 2019. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention – Review. *Curr. Drug. Targets*. 20, 302–315.
- Trišović, N., Božić, B., Obradović, A., Stefanović, O., Marković, S., Čomić, Lj., Božić, B., Ušćumlić, G., 2011. Structure-activity relationships of 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins as potential antiproliferative and antimicrobial agents. *J. Serb. Chem. Soc.* 76, 1597–1606.
- Vahora, H., Khan, M.A., Alalami, U., Hussain, A., 2016. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. *J. Cancer. Prev.* 21, 1–12.
- Vannini, F., Kashfi, K., Nath, N., 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox. Biol.* 6, 334–343.
- Zarghi, A., Arfaei, S., 2011. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran. J. Pharm. Res.* 10, 655–683.
- Zuliani, V., Carmi, C., Rivara, M., Fantini, M., Lodola, A., Vacondio, F., Bordin, F., Plazzi, P.V., Cavazzoni, A., Galetti, M., Alfieri, R.R., Petronini, P.G., Mor, M., 2009. 5-Benzylidene-hydantoins: synthesis and antiproliferative activity on A 549 lung cancer cell line. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 3471–3479.