

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mirna Z. Bulatović

**ISPITIVANJE ANTITUMORSKOG DELOVANJA  
6-[TRIFENILSTANIL]-1-HEKSANOLA VEZANOG  
ZA MEZOPOROZNI NANOMATERIJAL SBA-15  
U MODELU MIŠJEG MELANOMA  
*IN VITRO I IN VIVO***

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirna Z. Bulatović

**EVALUATION OF ANTITUMOR ACTIVITY OF  
6-(TRIPHENYLSTANNYL)HEXAN-1-OL LOADED  
IN SBA-15 MESOPOROUS NANOSTRUCTURED  
MATERIAL IN THE MOUSE MODEL OF  
MELANOMA *IN VITRO* AND *IN VIVO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

## **MENTORI**

dr Danijela Maksimović-Ivanić, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **KOMISIJA**

dr Danijela Maksimović-Ivanić, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Sanja Mijatović, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

dr Milica Markelić, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Kaluđerović, docent

Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany

*Mami, tati i mojoj Uni*

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera” (br. 173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Izražavam veliku zahvalnost mentoru, dr Danijeli Maksimović-Ivanić, na savesnom rukovođenju ovom disertacijom, usmeravanju tokom svih faza rada i pozitivnoj energiji.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Aleksandri Korać, na izvanrednoj saradnji i nesebičnoj pomoći tokom svih faza izrade disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem rukovodiocu projekta, dr Stanislavi Stošić-Grujičić, na ukazanom poverenju, na brizi, savetima i velikom zalaganju tokom svog istraživačkog rada.

Dr Sanji Mijatović, koja je podjednako posvećeno rukovodila disertacijom, posebno sam zahvalna na idejama, znanju i iskustvu koje mi je prenela.

Zahvaljujem se dr Goranu Kaluđeroviću na stručnom usmeravanju, kreativnoj saradnji, pomoći i smernicama u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se dr Milici Markelić, na ukazanom vremenu i konstruktivnim sugestijama tokom konačne izrade ove doktorske disertacije.

Mojoj kolegini, dr Mariji Mojić, dugujem zahvalnost za podršku i pomoć od samog početka svog istraživačkog rada.

Jeleni, Sandri, Marini i Ivani se zahvaljujem na pomoći, prijateljstvu, podršci i osmehu.

Hvala kolegama sa Odeljenja za imunologiju na sveukupnoj podršci i dobroj energiji, kao i kolegama sa Odeljenja za molekularnu biologiju i citologiju na pomoći i korisnim savetima.

***Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima***

## **Ispitivanje antitumorskog delovanja 6-[trifenilstanil]-1-heksanola vezanog za mezoporozni nanomaterijal SBA-15 u modelu mišjeg melanoma *in vitro* i *in vivo***

### **Sažetak**

Uprkos razvoju imunoterapije i ciljanih terapija, globalna incidenca melanoma nastavlja da raste. Konvencionalna hemoterapija, nažalost, pokazuje ograničenu efikasnost u lečenju metastatskog melanoma. Primenu najčešće korišćenog hemoterapeutskog leka cisplatine, ograničava urođena rezistencija ovog tipa tumora, što sve naglašava potrebu za razvojem efikasnije hemoterapije melanoma. Progres u medicinskoj organometalnoj hemiji omogućio je racionalni dizajn novih, nekonvencionalnih platinskih kompleksa, kao i neplatinskih antitumorskih jedinjenja, uključujući organokalajna jedinjenja, čija aktivnost ne počiva na direktnoj interakciji sa DNK. Međutim, nedovoljna rastvorljivost i toksičnost organokalajnih jedinjenja ograničava kompleksnija istraživanja i ulazak u klinička ispitivanja. U tom kontekstu, primena nanotehnologije u svrhu povećanja rastvorljivosti lekova i njihove selektivnosti prema maligno transformisanim klonovima u hemoterapiji kancera ima vodeću ulogu. Inkapsulacija hidrofobnih antitumorskih lekova u mezoporozne nanomaterijale silike, predstavlja najperspektivniju strategiju u ovoj oblasti. Zbog visokog potencijala za adsorpciju, nosač SBA-15 je najinteresantniji mezoporozni silikat za ciljanu isporuku lekova. U skladu sa tim, u ovoj studiji je po prvi put ispitivan antitumorski potencijal organokalajnog(IV) jedinjenja  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  skladištenog u mezoporozni materijal SBA-15 (SBA-15pSn) *in vitro* i *in vivo* u modelu mišjeg melanoma. Imajući u vidu izuzetnu heterogenost melanoma, ispitivan je i njihov uticaj na visoko invazivnu liniju humanog melanoma, A375. Analizirani su ćelijski i molekularni mehanizmi pokrenuti u odgovoru na tretman eksperimentalnim agensima u ćelijama melanoma, kao i mehanizam preuzimanja čestica SBA-15pSn u humane ćelije melanoma u sistemu *in vitro*.

$[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  u slobodnoj formi ali, mnogo potentnije, uskladišten u SBA-15 smanjio je vijabilitet ćelijskih linija melanoma poreklom od miša B16, i čoveka A375. Isti trend je zapažen u singenom modelu mišjeg melanoma *in vivo*. Pokazalo se da A375 ćelije melanoma preuzimaju SBA-15pSn pasivnim putem i makropinocitozom. U

osnovi antitumorskog delovanja eksperimentalnih jedinjenja bila je indukcija apoptoze i zastoj u proliferaciji ćelija melanoma. Međutim,  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  skladišten u SBA-15, ali ne i u slobodnoj formi, aktivira proces melanogeneze u B16 ćelijama melanoma, koji je bio praćen indukcijom prevremene ćelijske senescencije. Senescentni fenotip B16 ćelija, bio je povezan sa aktivacijom signalnog puta mitogenom-aktivirane protein kinaze p38 (p38 MAPK), dok je povećanje ekspresije markera diferencijacije mišjih ćelija melanoma bilo udruženo sa trajnom inhibicijom signalnog puta fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K). Paralelno, proces senescencije pokrenut SBA-15pSn u A375 ćelijama, bio je usklađen sa njihovom morfološkom transformacijom i povećanom zastupljenošću subpopulacije koja eksprimira fenotipski marker najranijih stadijuma razvića Švanovih ćelija - fenomen koji odlikuje terminalno diferencijirane melanocyte u nevisima. Analiza *Wnt*/ $\beta$ -katenin i *Notch* signalnih puteva, glavnih regulatora migracije melanocita tokom razvića, koji su često reaktivirani u melanomu, je ukazala da je izmenjeni fenotip A375 ćelija tretiranih SBA-15pSn bio u korelaciji sa oslabljenim metastatskim potencijalom humanih ćelija melanoma.

U celini, rezultati ove disertacije pokazuju da skladištenje hidrofobnih organokalajnih jedinjenja u uređene mezoporozne nanočestice silike unapređuje njihova svojstva, čime je omogućen nastavak prekliničkih ispitivanja sa krajnjim ciljem kreiranja uspešnije terapije melanoma.

**Ključne reči:** melanom, hemoterapija, ciljane isporuka lekova, mezoporozna silika, organokalajna jedinjenja, diferencijacija, ćelijska senescencija

**Naučna oblast:** Biologija tumora

**Uža naučna oblast:** Eksperimentalna onkologija

**UDK broj:** 616-006.81:615.38:[547.1'13+661.881]:[576.364:576.366](043.3)

**Evaluation of antitumor activity of 6-(triphenylstannyl)hexan-1-ol loaded in SBA-15 mesoporous nanostructured material in the mouse model of melanoma *in vitro* and *in vivo***

**Abstract**

Despite rapid development in immunotherapy and targeted therapies, the global incidence of melanoma continues to increase. Besides, conventional chemotherapy demonstrates only limited efficacy in the treatment of advanced melanoma. Clinical application of widely used chemotherapeutic drug cisplatin, is hampered by the intrinsic resistance of this type of tumor, indicating the urgent need for the development of more effective chemotherapies for melanoma. The rapid progress in medicinal organometallic chemistry in the past few years allows rational design of novel platinum compounds, as well as nonplatinum metal-based antitumor agents, including organotin compounds, whose activity is not based on unrepairable interaction with DNA. Poor solubility and toxicity of organotin compounds, however, restrains more complex studies and further development in the preclinical and subsequently clinical setting. Nanotechnology now becomes an important part of pharmaceutical research and development, for improving the solubility and selective toxicity of cancer therapeutics. Encapsulating hydrophobic antitumor agents in ordered mesoporous silica nanomaterials is an emerging strategy to enhance drug dissolution. Due to its high drug loading capacity, SBA-15 is the most interesting mesoporous silicate for targeted drug delivery. Antitumor potential of organotin(IV) compound  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  grafted on nanostructured material SBA-15 (SBA-15pSn) *in vitro* and *in vivo* in the mouse model of melanoma, was tested for the first time in this study. Considering the enormous heterogeneity of this type of tumor, it was of interest to test these experimental therapeutics in a highly invasive human A375 melanoma cell line. Given the fact that SBA-15pSn nanoparticles are relatively large, the mechanism of cellular uptake was defined. At the molecular level, main intracellular events triggered by the treatment, as well as the expression of key signaling pathways mediating tumor cell response, were analyzed.



[Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH], as a free compound, but more potently when grafted on SBA-15 material, reduced the growth of B16 and A375 melanoma cell lines *in vitro*. Tested compounds inhibited B16 melanoma tumor growth in syngeneic C57BL/6 mice. SBA-15pSn particles were taken up by macropinocytosis and nonspecific cellular uptake in A375 melanoma cells. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] and SBA-15pSn triggered caspase dependent apoptosis and cell cycle arrest in both melanoma cell lines. However, [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] grafted on SBA-15, but not as a free compound, stimulated melanin synthesis in B16 cells, followed by induction of premature cellular senescence, associated with activation of p38 signaling pathway. High expression of differentiation markers in SBA-15pSn treated B16 cells, was well synchronized with permanent inhibition of PI3K signaling pathway. In parallel, senescence triggered by SBA-15pSn in A375 melanoma cells, was associated with morphological transformation and enhanced percentage of Schwann-like cell subpopulation. This molecular signature characterizes terminally differentiated melanocytic nevus cells in the dermis. Downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin and Notch signaling pathways, critical regulators of melanocyte lineage development, which are often reactivated in melanoma, indicates that morphological changes of SBA-15pSn treated A375 cells correlated with lower metastatic potential of human melanoma cells.

Our findings demonstrate that encapsulating cytotoxic antitumor metal-based drugs in ordered mesoporous silica nanoparticles is a promising targeting strategy in an effort to diminish deleterious side-effects of chemotherapy and a creative approach to the design of novel anticancer therapeutics.

**Keywords:** melanoma, chemotherapy, targeted drug delivery, mesoporous silica, organotin compounds, differentiation, cellular senescence

**Research area:** Tumor biology

**Area of special interest:** Experimental oncology

**UDK number:** 616-006.81:615.38:[547.1'13+661.881]:[576.364:576.366](043.3)

## Lista skraćenica

3-MA – 3-metiladenin

AO – akridin oranž

APS – amonijum persulfat

ATCC – Američka kolekcija kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*)

BSA – goveđi albumin iz seruma (engl. *Bovine Serum Albumine*)

Cdk – ciklin-zavisna protein kinaza (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*)

CFSE – 5(6)-karboksifluorescein diacetat *N*-sukcinimidil estar

CSC – matične ćelije kancera (engl. *Cancer Stem Cells*)

CTLA4 – engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4*

DAF-FM – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat

DCT – dopahrom tautomeraza

DHR – dihidrorodamin 123

DMSO – dimetil sulfoksid

DNS – sindrom displastičnog nevusa (engl. *Dysplastic Nevus Syndrome*)

DTT – ditiotreitol

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

ERK – engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

FACS – engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*

FBS – goveđi fetalni serum (engl. *Fetal Bovine Serum*)

FDA – engl. *US Food and Drug Administration*

FDG – fluorescein di- $\beta$ -D-galaktopiranozid

FGF – faktor rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*)

FITC – fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)

FTI – inhibitori farnezil transferaze (engl. *Farnesyl Transferase Inhibitors*)

GA – glutaraldehid

GSK3 $\beta$  – kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$  (engl. *Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$* )

HGF – faktor rasta hepatocita (engl. *Hepatocyte Growth Factor*)

ID-1 – engl. *Inhibitor of Differentiation 1*

IFN- $\alpha$  – interferon- $\alpha$

IL-2 – interleukinom-2

iNOS – inducibilna azot oksid sintaza (engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*)

JNK – engl. *c-Jun N-terminal Kinase*

L-dopa – 3,4-dihidroksi- L-fenilalanin

MAGE – engl. *Melanoma Antigen*

MAPK – mitogenom-aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAT – engl. *Mesenchymal-to-Amoeboid Transition*

MC1R – engl. *Melanocortin-1 Receptor*

MCM-41– mezoporozna silika (engl. *Mobil Composition of Matter No. 41*)

MDR – engl. *Multiple-Drug Resistance*

Mel-CAM – engl. *Melanoma-Associated Cell Adhesion Molecule*

MITF – mikroftalmija-asocirani transkripcioni faktor (engl. *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*)

MMP – engl. *Matrix Metalloprotease*

MSN – mezoporozne nanočestice silike (engl. *Mesoporous Silica Nanoparticles*)

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

NO – azot oksid

OIS – engl. *Oncogene-Induced Senescence*

PD-1 – engl. *Programmed Death 1*

PFA – paraformaldehid

PI – propidijum jodid

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PICS – engl. *PTEN loss-Induced Cellular Senescence*

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

Rb – engl. *Retinoblastoma protein*

RGP – faza radijalnog rasta (engl. *Radial-Growth Phase*)

ROS/RNS – reaktivne vrste kiseonika i azota (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*)

RPMI – medijum za gajenje ćelija (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*)

SBA-15 – mezoporozna silika (engl. *Santa Barbara Amorphous-15*)

SCF – faktor matičnih ćelija (engl. *Stem-Cell Factor*)

SD – standardna devijacija

SDS – natrijum dodecil sulfat

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

TCF/LEF – engl. *T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*

TEM – transmisiona elektronska mikroskopija

TrxR/Trx – tioredoksin reduktaza/tioredoxin sistem

TYR – tirozinaza

TYRP – tirozinazi-srodan protein (engl. *Tyrosinase-Related Protein*)

UV – ultraljubičasto zračenje

VEGFR – engl. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VGP – faza vertikalnog rasta (engl. *Vertical-Growth Phase*)

WHO – Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

$\alpha$ -MSH –  $\alpha$ -melanocitni-stimulirajući hormon (engl.  *$\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone*)

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Melanociti .....	2
1.2. Homeostaza melanocita u koži čoveka .....	3
1.3. Melanom .....	4
1.4. Molekulska osnova razvoja melanoma .....	6
1.4.1. Ras/Raf/MEK/ERK signalni put .....	6
1.4.2. Ras/PI3K/Akt signalni put .....	7
1.4.3. Mikroftalmija-asocirani transkripcioni faktor .....	7
1.4.4. Prevazilaženje mehanizama senescencije .....	8
1.4.5. Ćelijska komunikacija u melanomu .....	9
1.5. Terapija melanoma.....	11
1.5.1. Hemoterapija .....	11
1.5.2. Ciljana terapija .....	12
1.5.3. Imunoterapija .....	14
1.6. Lekovi bazirani na jedinjenjima metala u terapiji kancera .....	16
1.7. Strategije dizajna lekova baziranih na jedinjenjima metala.....	18
1.8. Nanotehnologija i dizajn novih sistema za isporuku lekova.....	19
1.9. Sinteza i fizičkohemijaska karakterizacija $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ uskladištenog u SBA-15 mezoporozni materijal .....	22
<b>2. Ciljevi</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Materijal i metode</b> .....	<b>25</b>
3.1. Reagensi i rastvori.....	25
3.2. Kulture ćelija.....	27
3.2.1. B16 linija mišjeg melanoma .....	27
3.2.2. A375 linija humanog melanoma .....	27
3.2.3. Gajenje ćelija u kulturi .....	27
3.3. Eksperimentalne životinje.....	28
3.4. Metode .....	28
3.4.1. Tripsinizacija ćelija .....	28

3.4.2. Tripan plavo test.....	28
3.4.3. Testovi vijabiliteta.....	29
3.4.3.1. MTT test.....	29
3.4.3.2. Kristal violet test .....	29
3.4.4. Protočna citofluorimetrija .....	30
3.4.4.1. Analiza ćelijskog ciklusa.....	31
3.4.4.2. Analiza stope ćelijskih deoba.....	31
3.4.4.3. Detekcija ćelija u apoptozi .....	32
3.4.4.4. Detekcija aktivnosti kaspaza .....	32
3.4.4.5. Detekcija autofagije .....	32
3.4.4.6. Detekcija unutarćelijskog azot oksida.....	33
3.4.4.7. Detekcija produkcije reaktivnih vrsti kiseonika i azota .....	33
3.4.4.8. Detekcija aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze .....	34
3.4.4.9. Detekcija ekspresije membranskog CD271 receptora .....	34
3.4.5. Imunoblot .....	35
3.4.6. Detekcija markera diferencijacije .....	36
3.4.7. Svetlosna mikroskopija .....	36
3.4.8. Transmisiona elektronska mikroskopija .....	37
3.4.9. Preuzimanje nanočestica .....	37
3.4.10. Indukcija melanoma i tretman životinja.....	38
3.4.11. Određivanje parametara toksičnosti u urinu semikvantitativnom metodom.....	38
3.5. Statistička obrada podataka.....	39
<b>4. Rezultati.....</b>	<b>40</b>
4.1. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ inhibira rast ćelija melanoma <i>in vitro</i> ; adsorpcija na SBA-15 višestruko povećava citotoksični efekat jedinjenja.....	40
4.2. SBA-15pSn snažnije inhibira rast B16 ćelija melanoma <i>in vivo</i> u poređenju sa jedinjenjem u slobodnoj formi .....	42
4.3. Preuzimanje SBA-15pSn od strane ćelija melanoma odvija se pasivnim putem ili zahteva aktivaciju citoskeleta i formiranje filopodija.....	44
4.4. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn indukuju apoptozu ćelija melanoma zavisnu od aktivacije kaspaza .....	50

4.5. SBA-15pSn indukuje autofagiju u B16 ćelijama melanoma .....	52
4.6. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn inhibiraju proliferaciju ćelija melanoma .....	54
4.7. SBA-15pSn indukuje morfološku transformaciju ćelija melanoma .....	56
4.8. SBA-15pSn aktivira melanogenezu u B16 ćelijama koju prati ulazak u stanje prevremene senescencije.....	57
4.9. SBA-15pSn stimuliše produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsti u B16 ćelijama .....	60
4.10. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn menjaju aktivnost PI3K i MAPK signalnog puta u B16 ćelijama .....	61
4.10.1. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn indukuju prolaznu aktivaciju Akt i p70S6K koja se završava gašenjem ovog signalnog puta u B16 ćelijama.....	61
4.10.2. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ kontinuirano inhibira ERK, dok SBA-15pSn indukuje prolaznu inhibiciju ovog signalnog molekula u B16 ćelijama.....	63
4.10.3. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ uskladišten u SBA-15, ali ne i u slobodnoj formi, aktivira p38 signalni put u B16 ćelijama.....	64
4.10.4. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn snažno inhibiraju SAPK/JNK signalni put u B16 ćelijama.....	65
4.11. SBA-15pSn indukuje prevremenu senescenciju A375 ćelija melanoma.....	66
4.12. SBA-15pSn indukuje transdiferencijaciju A375 ćelija melanoma u ćelije nalik Švanovim .....	66
4.13. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn stimulišu produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsti u A375 ćelijama .....	67
4.14. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn menjaju aktivnost ključnih signalnih puteva koji regulišu adheziju, migraciju i invaziju A375 ćelija .....	69
4.14.1. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn negativno regulišu Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put.....	69
4.14.2. SBA-15pSn negativno reguliše ekspresiju Okt-3/4 transkripcionog faktora .....	70
4.14.3. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn negativno regulišu <i>Notch</i> signalni put .....	71
4.15. SBA-15pSn ukida međućelijsku komunikaciju A375 ćelija .....	72
<b>5. Diskusija .....</b>	<b>74</b>
<b>6. Zaključci.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>91</b>

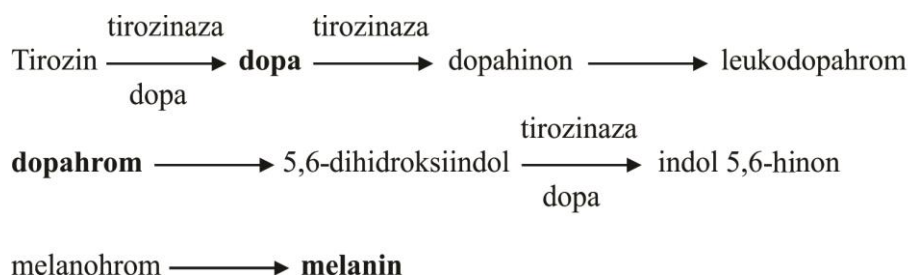
# 1. UVOD



## 1.1. Melanociti

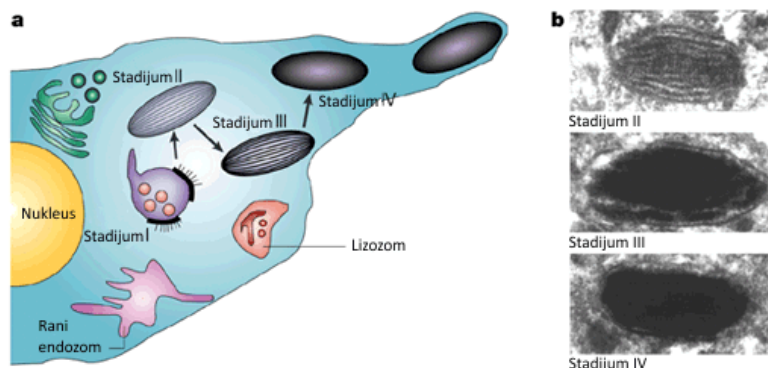
Melanociti su ćelije koje proizvode pigment melanin<sup>1</sup>. Postoje dva tipa melanocita kod sisara - *kutani* (folikularni, epidermalni) i *ekstrakutani* (horoidalni, kohlearni). Njihova diferencijacija obuhvata: migraciju i proliferaciju melanoblasta koji vode poreklo od embrionskih ćelija nervne kreste, sazrevanje melanocita (sinteza melanina, zadobijanje dendritičnog oblika), sazrevanje melanozoma i specifičan transport zrelih melanozoma u keratinocite. Melanogeneza je važan fiziološki proces u očuvanju homeostaze kože čoveka, a stepen produkcije pigmenta manifestuje se kao *fototip* kože (boja kože). Pigmentacija kože ima ključnu ulogu u zaštiti od ultraljubičastog (UV) zračenja, i u vezi je sa rizikom od nastanka kancera kože. U tom pogledu, pored zaštitnog efekta melanina *per se*, funkcija melanocita je važna i na mnogim drugim nivoima<sup>1-3</sup>.

Melanini su kompleksni pigmenti koji se sastoje iz kopolimera crnih i braon eumelanina i crvenih i žutih feomelanina<sup>4</sup>. Sinteza pigmenta se odvija u specifičnim membranskim organelama - melanozomima. Melanini se formiraju iz amino kiseline L-tirozin u seriji enzimskih i hemijskih reakcija koja se označava kao Raper-Mason put<sup>5</sup>. Ključni enzim u sintezi melanina je tirozinaza<sup>6</sup>. Biosinteza melanina započinje oksidacijom tirozina u 3,4-dihidroksifenilalanin (L-dopa) u reakciji koju katalizuje tirozinaza, pri čemu je dopa kofaktor. U sledećoj reakciji, tirozinaza katalizuje dehidrogenaciju dopa u dopahinon, nakon čega sledi niz reakcija autooksidacije koje se odvijaju spontano *in vitro*. Treća reakcija u melanogenezi koju katalizuje tirozinaza je konverzija 5,6-dihidroksiindola u indol-5,6-hinon, gde je dopa kofaktor<sup>7</sup> (Slika 1).



Slika 1 | **Biosinteza melanina.** Preuzeto od Körner and Pawelek 1982. *Science*. 217:1163-5.

Melanozomi sazrevaju u melanocitima i pigmentnim epiteljskim ćelijama mrežnjače kroz četiri morfološki različita stadijuma (Slika 2).

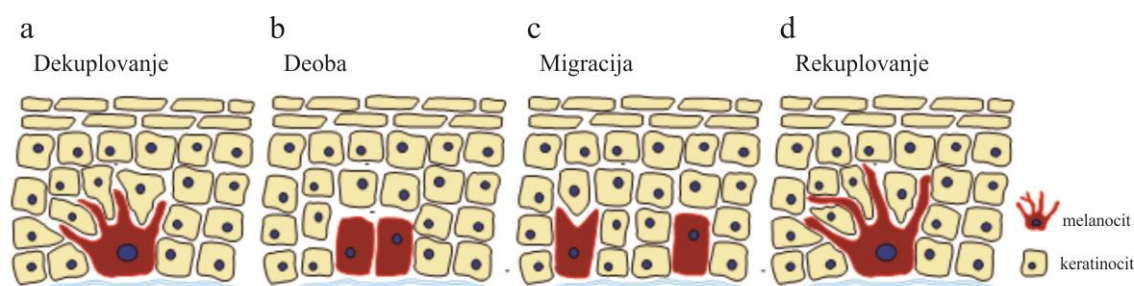


Slika 2 | **Sazrevanje melanozoma.** **a** | Šematski dijagram dela citoplazme i dendritskog nastavka melanocita. **b** | Elektron-mikrografije melanocita koje prikazuju II, III i IV stadijum sazrevanja melanozoma. Preuzeto od Marks and Seabra 2001. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:738-48.

U ranim fazama, melanozomi (premelanozomi) ne sadrže pigment, već proteinska vlakna koja počinju da se formiraju u stadijumu I. Ova vlakna formiraju pravilne paralelne pruge u elipsoidnom stadijumu II, što rezultuje karakterističnim izbrazdanim izgledom na nivou elektronske mikroskopije. Melanini se deponuju na vlaknima, što vodi ka zadebljanju i zatamnjenju melanozoma tokom sazrevanja do stadijuma III, dok celokupna struktura ne postane maskirana pigmentom u poslednjem stadijumu IV<sup>4,8</sup>. Zreli melanozomi se karakterišu pigmentnim depozicijama na vlaknima i, za razliku od melanozoma II stadijuma, sadrže melanogene enzime. Enzimi koji učestvuju u biosintezi melanina, tirozinaza (TYR), i tirozinazi-srodni proteini TYRP1 (engl. *tyrosinase-related protein 1*) i TYRP2 (engl. *dopachrome tautomerase*, DCT), transportuju se putem ranih endozoma do premelanozoma nakon formiranja vlakana na kojima se kasnije deponuje melanin<sup>4</sup>. U epidermalnim melanocitima, melanozomi IV stadijuma se kreću duž mikrotubula iz centra ćelije do dendritskih vrhova, gde ih potom preuzimaju susedni keratinociti. U keratinocitima, melanozomi se distribuiraju, i u odgovoru na UV zračenje, pozicioniraju strateški sa one strane jedra koja je izložena suncu. U pigmentnim epiteljskim ćelijama mrežnjače i horoidalnim melanocitima, melanozomi se permanentno deponuju, gde im je primarna funkcija apsorpcija zalutale svetlosti u oku i detoksifikacija oksidativnih intermedijera<sup>4,8</sup>.

## 1.2. Homeostaza melanocita u koži čoveka

Epidermalno-melaninska jedinica u bazalnom sloju humanog epidermisa predstavlja simbiotski odnos u kome jedan melanocit uspostavlja veze posredstvom svojih dendrita sa približno trideset šest keratinocita, i na taj način transportuje melanozome. Rezultat je distribucija pigmenta kroz bazalni sloj i gornje slojeve epidermisa koji štite kožu od UV zračenja<sup>9-11</sup>. Stabilan odnos broja melanocita i keratinocita se održava tokom celog života regulisanom indukcijom deobe melanocita. Da bi se melanociti podelili, potrebno je da se: (a) odvoje od bazalne lamine i povlačenjem dendrita od keratinocita - proces označen kao dekuplovanje, (b) podele se, i (c) migriraju duž bazalne lamine, pre nego što uspostave kontakt sa matriksom, kada (d) ponovo pružaju dendrite i uspostavljaju višestruke kontakte sa keratinocitima - proces rekuplovanja, kako bi se formirala nova epidermalno-melaninska jedinica. Kada se uspostavi adhezija, keratinociti kontrolišu rast i diferencijaciju melanocita<sup>12</sup> (Slika 3).



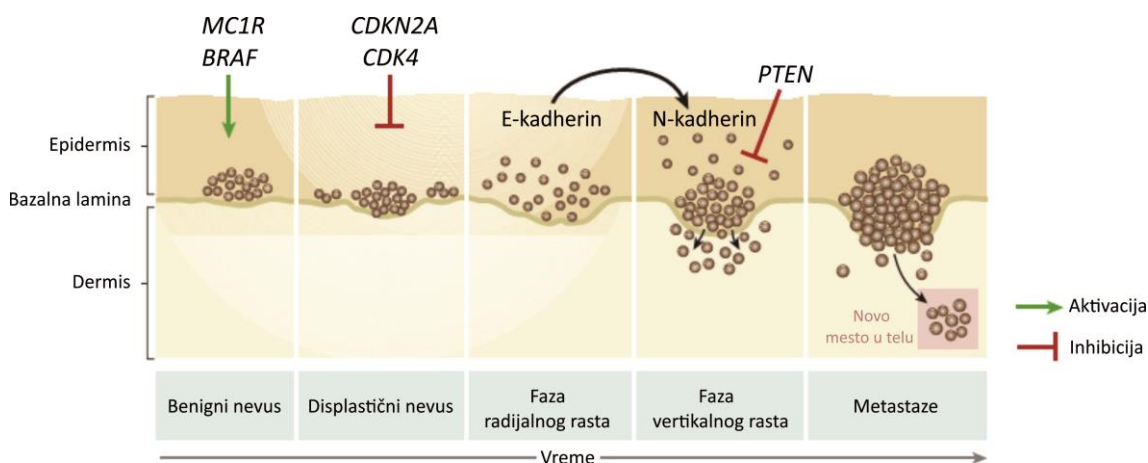
Slika 3 | **Homeostaza melanocita u humanom epidermisu.** Koraci u deobnoj kaskadi melanocita. Preuzeto od Haass and Herlyn 2005. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 10:153-63.

Migracija, ukotvljavanje u bazalnu laminu, formiranje dendrita i uspostavljanje veza sa keratinocitima, čime se uspostavlja kontrola rasta, kompletiraju ciklus koji održava stabilan odnos melanocita i epidermalnih keratinocita. Pretpostavlja se da integrini kadherini i *Notch* receptori imaju odlučujuću ulogu u procesima migracije i ponovnog uspostavljanja melaninske jedinice u epidermisu, koji se završavaju kada melanociti, nakon stimulacije UV zračenjem, transportuju pigment susednim keratinocitima<sup>12</sup>. U fiziološkom smislu, homeostaza određuje da li ćelija ostaje u stanju mirovanja, da li proliferiše, diferencira se ili podleže apoptozi<sup>13</sup>. Narušavanje homeostaze može da poremeti balans epidermalno-melaninske jedinice i izazove kontinuiranu deobu melanocita, što može da dovede do razvoja nevusa (madeža) ili melanoma<sup>12</sup>.

### 1.3. Melanom

Melanom je oblik kancera kože sa najvećim smrtnim ishodom i bez efikasne terapije<sup>14</sup>. Hirurg John Hunter prvi je operisao pacijenta sa melanomom 1787<sup>14</sup>, čiji se uzorak i danas čuva u Hunterian muzeju Kraljevskog koledža hirurga (engl. *Hunterian Museum of the Royal College of Surgeons*) u Engleskoj. Prvi opis ove bolesti i termin melanom, od grčke reči *melano*, što znači *crno* dao je Rene Leannec 1806. godine. William Norris je 1857. ukazao na postojanje korelacije između madeža, svetlog tena, naslednih faktora i melanoma<sup>14</sup>. Iz melanocita može da nastane set neoplazija sa različitom anatomskom distribucijom, kliničkim osobinama, histopatološkim izgledom i biološkim ponašanjem. Melanocitne neoplazije najčešće nastaju u koži, ali mogu da nastanu i transformacijom nekutanih melanocita. Benigne neoplazije melanocita označavaju se kao nevusi, dok se maligne zovu melanomi<sup>15</sup>. Trenutna kategorizacija Svetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*)<sup>16</sup>, bazirana na klasifikaciji melanoma koju su predložili Clark i saradnici pre 30 godina<sup>17</sup>, koristi morfološke aspekte radijalne faze rasta i mesto primarnog melanoma, na osnovu kojih se razlikuju četiri glavna histološka podtipa kutanog melanoma: melanom sa površinskim širenjem, nodularni melanom, akralni lentiginozni melanom i lentigo maligni melanom. Melanom sa površinskim širenjem je najčešći, i čini približno 70% svih slučajeva. Većina melanoma nastaju kao pojedinačne lezije bilo gde na koži. Pluća, jetra i mozak su najčešća mesta metastaza<sup>14</sup>. Najvažniji faktori rizika za melanom su porodična ili lična istorija melanoma, višestruki benigni ili atipični nevusi. Imunosupresija, osetljivost na sunce i izlaganje UV zračenju su dodatni faktori rizika<sup>18</sup>. U kliničkom smislu, varijacije u pigmentaciji su povezane sa različitim sklonošću za razvoj melanoma<sup>19,20</sup>. Na molekulskom nivou, izlaganje UV zračenju povećava pigmentaciju kože delom zahvaljujući delovanju  $\alpha$ -melanocitnog-stimulirajućeg hormona (engl.  *$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH*). Vezivanje  $\alpha$ -MSH za receptor melanokortin-1 (engl. *melanocortin-1 receptor, MC1R*) stimuliše ekspresiju enzima uključenih u produkciju melanina. Riđokosi i ljudi svetle puti imaju polimorfizme u *MC1R* genu<sup>21,22</sup> koji redukuju aktivnost receptora<sup>23</sup>, a samim tim i produkciju melanina, glavne odbrane melanocita od UV zračenja. Ovi polimorfizmi značajno povećavaju rizik od melanoma<sup>24</sup>. Clarkov model progresije melanoma opisuju histološke promene koje prate progresiju od melanocita do malignog melanoma<sup>25</sup>. Prema Clarkovom modelu, prva fenotipska promena u melanocitima je razvoj benignog

nevusa ili madeža. Proliferacija melanocita može da bude ograničena na epidermis (granični nevus), dermis (dermalni nevus) ili oba sloja kože (složeni nevus). Kontrola proliferacije u ovim ćelijama je poremećena, ipak rast nevusa je limitiran<sup>25,26</sup> (Slika 4). Progresija benignog nevusa je sprečena zahvaljujući ćelijskoj senescenciji indukovanoj onkogenom, gde je rast koji je stimulisan aktivacijom onkogenih puteva limitiran<sup>27</sup>. Sledeći korak je razvoj citološke atipije u displastičnom nevusu, koji može da nastane iz postojećeg benignog nevusa ili kao nova lezija. U fazi radijalnog rasta (engl. *radial-growth phase*, RGP), ćelije stiču sposobnost intraepidermalne proliferacije. U kliničkom smislu, predstavljaju uzdignute lezije i pokazuju citomorfološke karakteristike ćelija kancera. Ova faza u progresiji melanoma je povezana sa smanjenom diferencijacijom. Clark je predložio da nevusi regrediraju kroz diferencijaciju i da neuspeh ovog procesa vodi u displaziju<sup>25</sup>. Diferencijacija melanocita zahteva izlazak iz ćelijskog ciklusa i ekspresiju gena koji kodiraju proteine neophodne za produkciju pigmenta - procesi čija je regulacija narušena u melanomu. Lokalna invazija i metastatsko širenje su odgovorni za smrtnost od melanoma. Invazivne karakteristike se javljaju u fazi vertikalnog rasta (engl. *vertical-growth phase*, VGP), u kojoj ćelije melanoma ne samo da prodiru kroz bazalnu laminu, već rastu intradermalno u obliku čvorića (Slika 4). Ne prolaze svi melanomi kroz svaku pojedinačnu fazu - RGP ili VGP mogu da se razviju direktno iz izolovanih melanocita ili nevusa, zatim obe faze mogu da pređu direktno u metastatski maligni melanom, najsmrtonosniju fazu, infiltracijom u vaskularni i limfni sistem<sup>18,25</sup>.



Slika 4 | Postepene biološke i molekulske promene tokom progresije melanoma. Preuzeto od Ibrahim and Haluska 2009. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4:551-79.

Iako se u većini slučajeva melanomi javljaju sporadično, razumevanje genetičke osnove familijarnih melanoma, daje uvid u molekulsku patogenezu ove smrtonosne bolesti. Familijarni sindrom višestrukih atipičnih madeža (engl. *familial atypical multiple mole melanoma syndrome*) koji su opisali Lynch i saradnici 1983<sup>28</sup>, poznat i kao sindrom displastičnog nevusa (engl. *dysplastic nevus syndrome*, DNS), karakteriše rani razvoj velikog broja atipičnih madeža rasprostranjenih po celoj koži. Histološki pregled ovih madeža ukazuje na displastične odlike, a rizik za razvoj melanoma kod ovih ljudi je jako visok. Proučavanje ovog sindroma i prepoznavanje kao naslednog prekursora melanoma su imali značajan uticaj na istraživanje genetičke predispozicije melanoma<sup>14</sup>.

#### **1.4. Molekulska osnova razvoja melanoma**

Melanom je kompleksna genetička bolest. Protekle dve decenije, došlo je do značajnog progressa u otkrivanju genetičkih promena u melanomu. Mnoge mutacije su povezane sa specifičnom kliničkom ili histopatološkom podgrupom lezija, što snažno podržava ideju biološki različitih tipova melanocitnih neoplazija. Razumevanje bioloških procesa koji leže u osnovi inicijacije i progresije ove bolesti omogućiće bolju klasifikaciju i dizajn novih terapijskih pristupa. Strategije kao što su komparativna genomska hibridizacija i analiza mutacija sekvenciranjem gena, identifikovali su neke od najvažnijih signalnih puteva u ovoj bolesti<sup>15,26</sup>.

##### **1.4.1. Ras/Raf/MEK/ERK signalni put**

Ras/Raf/MEK/ERK signalni put reguliše ćelijske procese nizvodno od receptora tirozin kinaza i heterotrimernih receptora kuplovanih sa G proteinom<sup>29</sup>. U melanocitima, ovaj put aktiviraju faktori rasta kao što su faktor rasta matičnih ćelija (engl. *stem-cell factor*, *SCF* ili *c-kit ligand*), faktor rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF) i faktor rasta hepatocita (engl. *hepatocyte growth factor*, HGF)<sup>26</sup>. Ovaj signalni put je ključni regulator proliferacije ćelija melanoma, s obzirom da 90% humanih melanoma ima prekomerno aktiviran ERK<sup>30</sup> (engl. *extracellular signal-regulated kinase*). ERK može da aktivira produkciju autokrinih faktora rasta<sup>31</sup> ili ređe, mutacija koja aktivira receptore za faktore rasta kao što je c-Kit<sup>32</sup>. Češći mehanizam su somatske mutacije u *NRAS* genu, pri čemu je najčešća supstitucija leucina za glutamin na mestu 61 (Q61L). Ipak, najvažnija komponenta ovog signalnog puta u melanomu je *BRAF*, jedan od tri

*Raf* gena kod čoveka, zajedno sa *ARAF* i *CRAF*. Potraga za novim onkogenom navela je Davies i saradnike da identifikuju *BRAF* somatske *missense* mutacije u 66% malignih melanoma. Najčešća mutacija je supstitucija glutaminske kiseline za valin na poziciji 600 (V600E)<sup>33</sup>. *BRAF* mutacija je rani događaj tokom progresije melanoma. Oko 80% benignih nevusa ima V600E mutaciju. Javlja se sa sličnom frekvencijom u benignom nevusu i primarnim i metastatskim melanomima<sup>34</sup>, što navodi na zaključak da sama po sebi nije dovoljna za malignu transformaciju.

#### **1.4.2. Ras/PI3K/Akt signalni put**

Put fosfatidilinozitol 3-kinaze (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) reguliše rast, proliferaciju i pokretljivost ćelija, a prekomerno je eksprimiran u velikom procentu melanoma. Fosfatidilinozitol su membranski lipidi koji se konvertuju u sekundarne glasnike nakon fosforilacije jednim od članova PI3K familije<sup>35</sup>. Signalizacija se gasi delovanjem lipidne fosfataze PTEN (engl. *phosphatase and tensin homologue*). PI3K mutacije su zabeležene u 3% metastatskih melanoma, PTEN je inaktiviran u 20% melanoma, a protein kinaza B ili Akt je prekomerno eksprimiran u 60% melanoma<sup>36-38</sup>. Za supresiju rasta u tro-dimenzionalnim kulturama melanoma, moraju biti inhibirana oba puta, što označava da su ERK i PI3K signalni putevi podjednako važni<sup>39</sup>. Poznato je da onkogeni NRAS indukuje transformaciju melanocita efikasnije od mutiranog BRAF, pretpostavlja se zbog PI3K komponente. Zanimljivo je međutim, da su *BRAF* mutacije češće od *NRAS* mutacija, što je verovatno odraz drugih genetičkih ili bioloških pritisaka koji favorizuju progresiju melanoma sa *BRAF* mutacijama<sup>26</sup>.

#### **1.4.3. Mikroftalmija-asocirani transkripcioni faktor**

Mikroftalmija-asocirani transkripcioni faktor, MITF (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*) je glavni regulator biologije melanocita, koji ne kontroliše samo melanogenezu, već različitim mehanizmima diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu melanocita<sup>40-42</sup>. Unutarćelijski signalni put indukovani vezivanjem  $\alpha$ -MSH za MC1R povećava nivo MITF, koji zatim koordinisano reguliše ekspresiju pigmentnih gena<sup>18</sup>. Pored tirozinaze, TYRP1 i TYRP2, MITF reguliše ekspresiju melanogenih proteina - dijagnostičkih markera ove bolesti kao što su gp100, melan-A i melastatin. Smanjena pigmentacija i ekspresija ovih gena je povezana sa progresijom nevusa u melanom.

MITF se eksprimira u većini humanih melanoma i esencijalan je za preživljavanje ćelija melanoma<sup>18,40-42</sup>. Međutim, nivo ovog proteina je precizno regulisan<sup>26</sup>. MITF se eksprimira u značajno nižem nivou u ćelijama melanoma u poređenju sa melanocitima, a povećanje nivoa redukuje proliferaciju ćelija melanoma, čak i u prisustvu onkogenog BRAF<sup>43</sup>. Pretpostavlja se da MITF reguliše brojne funkcije u melanocitima na različitim nivoima ekspresije<sup>26</sup>. Visok nivo indukuje zastoj u ćelijskom ciklusu i diferencijaciju, putem kontrole regulatora ćelijskog ciklusa kao što su p16<sup>INK4a</sup>, Cdk2 (engl. *cyclin-dependent kinase 2*) i p21<sup>Cip</sup>, dok kritično nizak nivo dovodi do apoptoze. Samo na intermedijarnom nivou je favorizovana proliferacija. U tom kontekstu, konstitutivno aktiviran ERK koji je ključan za preživljavanje ćelija melanoma, indukuje konstantno smanjenje nivoa MITF, jer ga fosforilacijom obeležava za degradaciju<sup>26</sup>. U skladu sa tim, ćelije melanoma su razvile strategije da povrata nivo MITF koji je kompatibilan sa progresijom tumora<sup>26</sup>. Identifikacija povećanog broja kopija regiona u hromozomu 3 koji obuhvata *MITF* lokus u malom procentu metastatskih melanoma u kojima je mutiran BRAF<sup>44</sup>, označava *MITF* kao onkogen<sup>18</sup>. Uprkos činjenici da gen može da bude amplifikovan 10-100 puta, nivo MITF se povećava 1.5 puta u poređenju sa ćelijama bez amplifikacije<sup>44</sup>, što opet ukazuje da se nivo MITF održava unutar uskih granica<sup>26</sup>. Kako samo 10-16% *BRAF*-mutiranih melanoma ima amplifikaciju *MITF*, postavlja se pitanje kako ostalih 84-90% neutrališe degradaciju MITF posredovanu prekomernom aktivacijom ERK signalnog puta<sup>26</sup>. Jedan od mogućih mehanizama uključuje β-kenenin, koji indukuje ekspresiju MITF putem LEF-1/TCF vezujućeg mesta *MITF* promotora<sup>45</sup>. Iako su mutacije β-kenenina retke u melanomu, nukleusna/citosolna lokalizacija β-kenenina je pronađena u 28% metastatskih melanoma<sup>46</sup>.

#### **1.4.4. Prevazilaženje mehanizama senescencije**

Somatske ćelije imaju ograničen proliferativni potencijal. Nakon određenog broja deoba napuštaju ćelijski ciklus i ulaze u stanje senescencije<sup>47</sup>. Ćelijska senescencija je ključni odbrambeni mehanizam od kancera jer zaustavlja proliferaciju, a sam proces je fiziološki relevantan zato što ga indukuju aktivirani onkogeni u normalnoj ćeliji. Ćelije kancera prevazilaze ovaj mehanizam inaktivacijom puteva koji regulišu p16<sup>INK4a</sup>/Rb (engl. *retinoblastoma protein*) i p53<sup>48</sup>. Tumor supresorski protein p16<sup>INK4a</sup> se vezuje za ciklin-zavisne protein kinaze Cdk4/6, blokira njihovu aktivnost i sprečava fosforilaciju

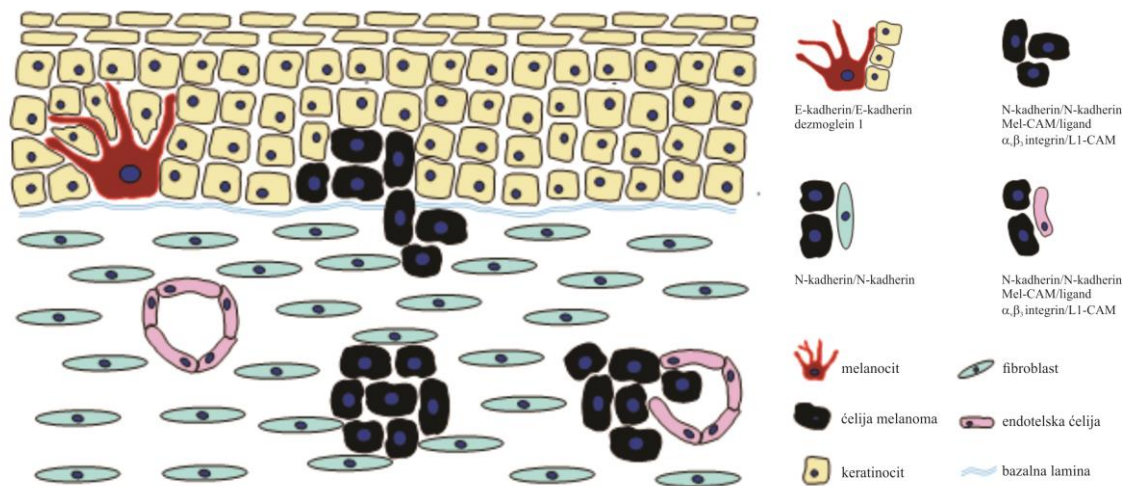


tumor supresora Rb<sup>49</sup>. p16<sup>INK4a</sup> kodira *CdkN2A*, lokus koji takođe kodira p14<sup>ARF</sup> (p19<sup>ARF</sup> kod miša) sa različitog promotora i korišćenjem alternativnog okvira čitanja<sup>50</sup>. *CdkN2A* mutacije generalno utiču na p16<sup>INK4a</sup> u slučajevima porodičnog melanoma. Mutacije u *Cdk4* ometaju vezivanje za p16<sup>INK4a</sup><sup>50</sup>. Somatske mutacije u ovim genima se takođe nalaze u većini sporadičnih melanoma. p16<sup>INK4a</sup> se inaktivira tačkastim mutacijama, delecijama, metilacijom promotora<sup>51</sup> ili prekomernom ekspresijom transkripcionog supresora ID1<sup>52</sup> (engl. *inhibitor of differentiation 1*). Većina ćelijskih linija melanoma ima defekt u p16<sup>INK4a</sup> ili Rb, kao i prekomernu ekspresiju Cdk4 ili ciklina D1<sup>26</sup>. Da bi sprečile senescenciju ćelije melanoma inaktiviraju p16<sup>INK4a</sup>/Rb signalni put<sup>47</sup>. Poznato je da V<sup>600E</sup>BRAF indukuje ekspresiju p16<sup>INK4a</sup> i senescenciju humanih melanocita *in vitro*. Zatim, povećanje ekspresije p16<sup>INK4a</sup> doprinosi indukciji senescencije u nevusu<sup>53,54</sup>. Defekti u p16<sup>INK4a</sup> postoje u displastičnim, ali ne i u benignim nevusima<sup>55</sup>. U skladu sa svim, predložen je model prema kome p16<sup>INK4a</sup> predstavlja kočnicu transformaciji melanocita koju indukuje V<sup>600E</sup>BRAF. Prema ovom modelu, mutacija u *BRAF* ili *NRAS* vodi ka hiperprolifraciji; posledica je indukcija senescencije koju posreduje p16<sup>INK4a</sup>, pri čemu se formira nevus koji sadrži klonove senescentnih melanocita<sup>26</sup>. Pored toga, senescencija može da bude indukovana drugim faktorima. Ostali mehanizmi uključuju p53 koji predstavlja rezervnu kontrolnu tačku u melanocitima nakon neuspeha p16<sup>INK4a</sup>-zavisne senescencije<sup>47,53</sup>.

#### 1.4.5. Ćelijska komunikacija u melanomu

Invazija i širenje melanoma su povezani sa promenama u ćelijskoj adheziji. Normalno, ćelijska adhezija kontroliše migraciju ćelija, tkivnu organizaciju i organogenezu<sup>56</sup>. Sa druge strane, poremećaji u ćelijskoj adheziji doprinose invaziji tumora<sup>18</sup>. Smatra se da ćelije melanoma izbegavaju kontrolu keratinocita putem pet glavnih mehanizama: (1) smanjenjem ekspresije receptora koji su neophodni za komunikaciju sa keratinocitima kao što su E-kadherin, P-kadherin i dezoglein; (2) povećanjem ekspresije receptora i signalnih molekula za komunikaciju ćelija melanoma i interakcije sa fibroblastima kao što su N-kadherin i Mel-CAM; (3) poremećajem regulacije morfogena - *Notch* receptora i njihovih liganda, koji tokom razvića usmeravaju migraciju i pravilno pozicioniranje melanocita u epidermisu; (4) putem promenjene ekspresije adhezivnih molekula koji

posreduju u formiranju veza sa vanćelijskim matriksom i indukuju odvajanje od bazalne lamine i (5) povećanom produkcijom metaloproteinaza<sup>12</sup> (Slika 5).



Slika 5 | **Komunikacija ćelija u melanomu.** Preuzeto od Haass and Herlyn 2005. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*10:153-63.

Promene u mikrosredini kože koje povećavaju lokalnu produkciju faktora rasta mogu da izazovu odvajanje melanocita od keratinocita, kao prvi korak u neregulisanoj (nevus) proliferaciji<sup>12</sup>. E-kadherin je najznačajniji adhezivni molekul epidermalnih melanocita i keratinocita<sup>57</sup>. Pored kontakata posredovanih E-kadherinom, dezmozomi imaju ulogu u održavanju homeostaze humane kože. Iako melanociti ne ostvaruju adhezivne veze sa keratinocitima po tipu dezmozoma, oni eksprimiraju dezmozolein 1 koji nestaje tokom progresije melanoma. Progresija u VGP fazu rasta obeležena je gubitkom E-kadherina i povećanom ekspresijom N-kadherina. Nov adhezivni profil menja ćelijske partnere melanocita u one koji eksprimiraju N-kadherin kao što su fibroblasti i endotelne ćelije krvnih sudova, koji podržavaju migraciju i invaziju ćelija melanoma<sup>58-60</sup>. Promene u ekspresiji kadherina podstiču migraciju ćelija melanoma stimulacijom signalnog puta  $\beta$ -katenina<sup>61,62</sup>. Prelaz u VGP fazu melanoma, takođe je povezan sa ekspresijom  $\alpha_v\beta_3$  integrina, što omogućava lokalizaciju MMP-2 (engl. *matrix metalloproteases* 2) na površini invazivnih ćelija, direktnim vezivanjem za  $\alpha_v\beta_3$  integrin. MMP-2 razgrađuje kolagen u bazalnoj lamini i stimuliše pokretljivost ćelija melanoma reorganizacijom citoskeleta<sup>63,64</sup>.

## 1.5. Terapija melanoma

Tokom protekle dve decenije, paradigma u terapiji kancera evoluirala je od relativno nespecifičnih citotoksičnih agenasa do selektivnih terapeutika. Hemoterapije kancera su inicijalno kreirane identifikacijom jedinjenja koja su citotoksična za ćelije koje se brzo dele<sup>65</sup>. Ovi lekovi ostaju okosnica aktuelne terapije, ali su ograničeni malim terapijskim indeksom, toksičnošću i vrlo često stečenom rezistencijom. Progres u fundamentalnoj biologiji kancera omogućio je razvoj novih terapijskih pristupa, uključujući ciljne agense i imunoterapiju kancera<sup>65</sup>. Ciljne terapije inhibiraju molekulske puteve koji su ključni za rast tumora, dok imunoterapija stimuliše imunski odgovor kojim se postiže dugotrajna destrukcija tumora. Ciljne terapije i citotoksični agensi takođe modulišu imunski odgovor, što daje mogućnost da se ove terapijske strategije kombinuju sa imunoterapijom<sup>65</sup>. Jedina efikasna terapija melanoma je hirurško isecanje ranih lezija<sup>14</sup>, dok diseminacije melanoma predstavljaju jedan od najrezistentnijih humanih kancera uprkos decenijama istraživanja citotoksičnih, imunoloških i ciljanih agenasa<sup>66,67</sup>.

### 1.5.1. Hemoterapija

Metilirajući agens, dekarbazin, ostaje najefikasniji hemoterapeutski agens odobren od strane Uprave za hranu i lekove Sjedinjenih Država za terapiju metastatskog melanoma (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA). Nijedan hemoterapeutik trenutno nema stopu odgovora veću od 25%<sup>68</sup>. Cisplatina i karboplatina imaju skromnu aktivnost kao pojedinačni agensi kod pacijenata sa metastatskim melanomom<sup>66</sup>. Derivati nitrozouree lako prolaze krvno-moždanu barijeru, zbog čega su često uključeni u kombinovanim hemoterapeutskim režimima. Fotemustin je prvi lek koji je pokazao značajnu efikasnost u terapiji metastaza na mozgu<sup>66</sup>. Vinka alkaloidi i taksani se retko koriste u monoterapiji metastatskog melanoma, već su deo kombinovanih režima<sup>66</sup>. Najznačajnije kombinacije CVD (cisplatina, vinblastin, dekarbazin)<sup>69</sup> i Dartmouthov režim (cisplatina, dekarbazin, karmustin, tamoksifen)<sup>70</sup> nisu pokazali superioran efekat u kliničkim ispitivanjima kod pacijenata sa metastatskim melanomom u poređenju sa dekarbazinom<sup>71</sup>.

### 1.5.2. Ciljana terapija

Prema konceptu *onkogene zavisnosti* (engl. *oncogene addiction*) tumorske ćelije se mnogo više oslanjaju na prekomerno aktivirane signalne puteve od normalnih ćelija<sup>26</sup>. Osetljivost ćelija kancera na inhibiciju onkogenih puteva predstavlja polaznu osnovu za ciljane terapije. Prvi lekovi usmereni na Ras/Raf/MEK/ERK put koji su ušli u klinička ispitivanja su inhibitori farnezil transferase (engl. *farnesyl transferase inhibitors*, FTI), dizajnirani da blokiraju esencijalne post-translacione modifikacije Ras proteina<sup>26</sup>. Zbog nespecifičnosti, FTI tipifarnib nije pokazao efikasnost u II fazi kliničkih ispitivanja kod pacijenata sa metastatskim melanomom<sup>72</sup>. Pre otkrića *BRAF* onkogen<sup>33</sup>, preovladavalo je mišljenje da je CRAF najvažniji efektor Ras proteina<sup>73</sup>. Očekivano, CRAF inhibitor sorafenib<sup>74</sup> nije pokazao aktivnost u terapiji melanoma<sup>75,76</sup>. Nakon toga počinje ubrzani klinički razvoj <sup>V600E</sup>BRAF inhibitora. Vemurafenib<sup>77-80</sup> je prvi lek odobren 2011. u Sjedinjenim Državama za terapiju metastatskog melanoma sa *BRAF* mutacijom<sup>73</sup>. Već 2013, FDA je odobrila lek dabrafenib<sup>81</sup>, takođe inhibitor <sup>V600E</sup>BRAF i trametinib<sup>82</sup>, prvi MEK inhibitor koji se primenjuje u terapiji melanoma sa *BRAF* mutacijom. Međutim, uprkos očiglednim prednostima terapije BRAF ili MEK inhibitorima, većina pacijenata vremenom pokazuje znake progresije bolesti. Do sada su opisani višestruki mehanizmi rezistencije na BRAF inhibitore uključujući razvoj simultanih *NRAS* ili *MEK* mutacija, amplifikacija ili alternativno splajsovanje mutiranog *BRAF* gena, povećanje ekspresije faktora rasta ili receptora tirozin kinaza, što rezultuje u reaktivaciji puta MAP kinaza<sup>83-86</sup> (engl. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Zatim, BRAF inhibitori posreduju jako čudan paradoks. Dok u ćelijama sa *BRAF* mutacijom inhibiraju MAPK put, u prisustvu onkogenog *RAS*, posreduju u formiranju homo/heterodimera RAF izoformi koje stimulišu prekomernu aktivaciju ERK signalnog puta. Ovaj efekat je nezavisan od inhibicije kinaze u ćelijama sa *wild-type* BRAF, već je povezan sa konformacionom promenom Raf kinaze kao posledica vezivanja inhibitora<sup>87-89</sup>. Razvoj karcinoma skvamoznih ćelija i sekundarnih melanoma, predstavlja dugoročni efekat terapije melanoma BRAF inhibitorima. Paradoksalna aktivacija kompenzatornog MAPK puta može da *probudi* već postojeće mutirane ćelije u telu<sup>86</sup> i možda prethodi razvoju sekundarnih tumora kože<sup>90-93</sup>. Retki slučajevi razvoja nekutanih kancera su zabeleženi kod pacijenata sa metastatskim melanomom nakon terapije vemurafenibom kao rezultat skrivenih *RAS* mutacija<sup>94</sup>. Ukoliko je primarni pokretač sekundarnih tumora aktivacija

MAPK puta, praktičan pristup u prevenciji ovog efekta je kombinovana terapija MEK ili ERK inhibitorima<sup>86</sup>. Alternativni pristup uključuje novu klasu pan-RAF inhibitora, tzv. *prekidača paradoksa*, koji su selektovani zahvaljujući odsustvu paradoksalne aktivacije MAPK puta u ćelijama melanoma sa mutiranim *NRAS*<sup>95,96</sup>. Na osnovu rezultata I/II faze kliničkih ispitivanja, kombinacija dabrafeniba i trametiniba<sup>97</sup>, je ubrzanim postupkom dobila odobrenje Uprave za hranu i lekove Sjedinjenih Država za terapiju metastatskog melanoma sa <sup>V600E</sup>*BRAF* ili ređom, <sup>V600K</sup>*BRAF* mutacijom. Ovi rezultati su ponovljeni u III fazi ispitivanja<sup>98,99</sup>, kada je postignuta stopa odgovora 67%<sup>100</sup>. I mada kombinovani režim redukuje incidencu sekundarnih tumora i povećava stopu odgovora, rezistencija je neminovna, tako da nedostaju terapijske opcije za pacijente koji razviju rezistenciju na ciljane agense koji su trenutno na tržištu<sup>100</sup>. Ćelije melanoma sa *BRAF* mutacijom su osetljivije na MEK inhibitore od ćelija sa mutiranim *Ras* ili *wild-type* ćelija<sup>101</sup>, što ukazuje da aktivacija drugih Ras efektoru čini melanom *manje zavisnim* od MEK signalnog puta ili, da su ćelije sa *BRAF* mutacijom *više zavisne* od ovog signalnog puta<sup>26</sup>. Takođe, *zavisnost* melanoma od PI3K/Akt signalnog puta ukazuje kako bi Raf/MEK inhibitori mogli uspešno da se kombinuju sa PI3K, Akt ili mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) inhibitorima<sup>73</sup>. Nedostatak PI3K/Akt inhibitora skrenuo je pažnju na brojne mTOR inhibitore<sup>102</sup>. Nažalost, I/II faza kliničkih studija analoga rapamicina, temsirolimusa, kao pojedinačnog agensa ili u kombinaciji sa sorafenibom u terapiji metastatskog melanoma završena je neuspešno<sup>103–105</sup>. Melanomi predstavljaju veoma vaskularizovane tumore, koji prekomerno ekspimiraju angiogene faktore<sup>102</sup>. U II fazi kliničkih ispitivanja, aksitinib, selektivni inhibitor VEGFR (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*), postigao je uspeh kao pojedinačni agens i u kombinaciji sa hemoterapijom kod pacijenata sa metastatskim melanomom<sup>106,107</sup>. Vitaksin,  $\alpha_v\beta_3$  antitelo je još jedan kandidat za antiangiogenu terapiju metastatskog melanoma<sup>108</sup>. U II fazi kliničkih studija, tirozin kinazni inhibitor imatinib, zabeležio je uspeh kod pacijenata sa metastatskim melanomom koji su nosioci samo određenih *KIT* mutacija<sup>109–111</sup>.

### 1.5.3. Imunoterapija

Spoznaja da lezije primarnog melanoma mogu da poseduju regione spontane regresije, u kombinaciji sa histološkim dokazom da infiltracija T ćelija korelira sa povoljnijom prognozom<sup>112</sup>, postavlja imunoterapiju u prvi plan terapijskih pristupa melanomu. Nažalost, nekoliko decenija translacionih istraživanja u oblasti imunologije kancera nije pružilo značajan pomak u lečenju metastatskog melanoma<sup>67</sup>. Umesto toga, ovi naponi su ukazali na različite i sofisticirane puteve uz pomoć kojih ćelije melanoma odolevaju imunskoj destruktiji. Uprkos tome, imunomodulatorni agensi su uspeali da izazovu redak ali izrazit imunski odgovor. Deo pacijenata sa metastatskom bolešću može da se izleči na ovaj način, što je u suprotnosti sa postojećim iskustvom u hemoterapiji<sup>67</sup>. Uprkos ohrabrujućim rezultatima<sup>113,114</sup>, imunoterapija melanoma interferonom- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) ili interleukinom-2 (IL-2), otežana je značajnom toksičnošću koja ograničava primenjenu dozu<sup>115</sup>. Toksičnost povezana sa sistemskom IFN- $\alpha$  ili IL-2 terapijom, dovela je do modifikacija doze i serije kombinovanih režima sa hemoterapijom - biohemoterapija<sup>116-119</sup>. Kako klinička ispitivanja do sada nisu pokazala prednost kombinovanih režima, biohemoterapija metastatskog melanoma još uvek nije zaživela<sup>67</sup>. Pre dvadeset godina, prvi pacijent sa melanomom je uspešno izlečen vakcinacijom kratkim peptidom, koji je zapravo prvi identifikovani tumor-specifični T-ćelijski epitop MAGE (engl. *melanoma antigen*). Od tada, melanom predstavlja model sistem za imunoterapiju kancera<sup>120</sup>. Kategorije vakcina u terapiji melanoma obuhvataju: (1) ćelijske vakcine; (2) vakcine bazirane na proteinima i peptidima (gp100, tirozinaza, Melan-A/MART-1, MAGE, NY-ESO-1); (3) vakcine bazirane na dendritskim ćelijama; (4) anti-idiotipske vakcine; (5) glikolipidne vakcine i (6) vakcine bazirane na nukleinskim kiselinama<sup>121</sup>. Otkriće tumor-specifičnih neoantigena, koji indukuju potentan imunski odgovor, ponovo je otvorilo mogućnost uspešne terapije melanoma antitumorskim vakcinama<sup>122,123</sup>. Naime, pokazano je da CD8 T ćelijski odgovor na tumorske neoantigene, može da se osnaži vakcinacijom pacijenata sa melanomom<sup>124</sup>. Najznačajniji terapijski pristup u aktivaciji antitumorskog odgovora predstavlja inhibicija imunskih kontrolnih tački koje se odnose na brojne inhibitorne puteve koji su važni za očuvanje tolerancije na sopstvene antigene i modulaciju trajanja i amplitude fiziološkog imunskog odgovora. CTLA4 antitela (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), prvi imunoterapeutici ovog tipa odobreni u Sjedinjenim Američkim Državama, primarno sprečavaju aktivnost ko-stimulatornog

receptora T ćelija, CD28. Iako su aktivnost, stopa odgovora u II fazi ispitivanja i profili toksičnosti slični za ipilimumab i tremelimumab, dva humanizovana CTLA4 antitela, ipilimumab je bio daleko uspješniji u III fazi kliničkih ispitivanja<sup>125</sup> kod pacijenata sa metastatskim melanomom. S obzirom da je ipilimumab prvi lek koji je pokazao benefit, iskazan kroz duže ukupno preživljavanje, odobren je 2010. za terapiju metastatskog melanoma<sup>126</sup>. Mnogo značajniji je efekat ipilimumaba na dugotrajno preživljavanje; 18% pacijenata preživelo je duže od dve godine<sup>125</sup>. Ovi podaci podržavaju koncept prema kome imunoterapeutici *edukuju* imunski sistem da drži tumor pod kontrolom nakon završetka terapije<sup>126</sup>. Uspeh terapije ovim lekom delimično je zasenjen niskom stopom odgovora (11%) i njegovom toksičnošću<sup>125,127</sup>. Pembrolizumab i nivolumab, anti-PD-1 monoklonska antitela, odobreni su krajem 2014. u Sjedinjenim Državama za terapiju metastatskog melanoma<sup>128,129</sup>. Selektivno blokiraju interakciju PD-1 receptora (engl. *programmed death 1*) sa ligandima programirane smrti, PD-L1 i PD-L2, odnosno negativni signal koji reguliše aktivaciju i proliferaciju T ćelija. Vrlo karakteristično za novu generaciju imunskih inhibitora je visoka stopa odgovora, što prevazilazi generalno prihvaćeno gledište prema kome je imunoterapija povezana sa dugoročnim odgovorom kod malog broja pacijenata, dok ciljane terapije karakteriše visoka stopa odgovora koji je često kratkog daha<sup>128</sup>.

Analiza prednosti i mana ciljanih agenasa i imunoterapija ukazuje da oba pristupa imaju komplementarne uloge u terapiji kancera, i da kombinacija može da deluje sinergistički. Ciljane terapije potenciraju antitumorski imunski odgovor indukcijom senescencije tumorske ćelije čime olakšavaju uklanjanje tumora T ćelijama<sup>130</sup>. Zatim, oslobađanje velike količine antigenskog debrisa nakon smrti tumorske ćelije može da doprinese uspehu vakcinacije *in situ*. U tom smislu, imunoterapija može da konsoliduje snažan antitumorski odgovor koji se postiže ciljanom terapijom u trajnu remisiju u kojoj imunski sistem redukuje rizik potencijalno letalnih klonova tumorskih ćelija rezistentnih na lek<sup>65</sup>.

## 1.6. Lekovi bazirani na jedinjenjima metala u terapiji kancera

Metalni joni imaju važnu ulogu u biološkim procesima<sup>131</sup>. Jedan od prvih lekova na bazi jedinjenja metala bio je salvarsan, organsko jedinjenje arsena koje je razvio Paul Ehrlich za terapiju sifilisa<sup>132</sup>. U ovoj studiji je po prvi put hemijskim modifikacijama optimizovana biološka aktivnost jedinjenja i pokazano da je moguće boriti se protiv infektivnih bolesti kroz sistemsku pretragu lekova koji ubijaju patogene, bez efekta na zdrava tkiva - Ehrlichova ideja *magičnog metka* ili ciljanog leka<sup>131,133</sup>. Iako se salvarsan smatra prvim hemoterapeutskim lekom i često citira kao početak modernog istraživanja i razvoja lekova baziranih na jedinjenjima metala, najznačajniji lek u ovoj oblasti je cisplatin<sup>131</sup>, slučajno otkrivena 1965. dok su Barnett Rosenberg i Loretta Van Camp proučavali efekat električne struje na bakteriju *Escherichia coli*. Primitili su da *cis*-diamindihloridoplatin(II) jedinjenje, koje se proizvodi iz platinskih elektroda, inhibira ćelijsku deobu<sup>134,135</sup>. FDA je već 1978. odobrila ovaj agens za terapiju kancera testisa i ovarijuma, a danas predstavlja deo standardne terapije različitih tipova kancera. I pored uspeha, terapijski efekat cisplatine je povezan sa izrazitom nefrotoksičnošću, koja nije u potpunosti kasnije prevaziđena drugom generacijom platinskih lekova, karboplatinom i oksaliplatinom<sup>131,136</sup>. Razvoj neklasičnih platina(IV) kompleksa kao što je satraplatina, ima za cilj prevazilaženje stečene ili urođene rezistencije na platinske lekove. Prednost satraplatine je mogućnost oralne primene, što je pogodnije za pacijente i redukuje troškove lečenja<sup>131</sup>. Pored istraživanja platinskih lekova, koordinaciona jedinjenja i organometalni kompleksi galijuma KP46<sup>137</sup> i rutenijuma NAMI-A i KP1019<sup>138,139</sup>, već su ušli u fazu kliničkih ispitivanja. Prednost rutenijumskih kompleksa je antimetastatska aktivnost<sup>140,141</sup>. Nov pristup dizajnu antitumorskih lekova baziranih na jedinjenjima metala, predstavljaju agensi koji deluju na puteve prekomerno eksprimirane u ćelijama kancera<sup>142</sup>. Primeri metalnih kompleksa koji interaguju sa specifičnim proteinima ili enzimima uključuju komplekse galijuma (ribonukleotid reduktaza), zlata (glutation reduktaza i tioredoksin reduktaza), kalaja (tioredoksin reduktaza)<sup>143,144</sup>, rutenijuma (glikogen sintaza kinaza), kobalta (ciklooksigenaza), renijuma i paladijuma (katepsin B)<sup>142</sup>. Mogućnost delovanja na redoks balans tumorskih ćelija je takođe vrlo efikasna strategija<sup>145</sup>. Metalni kompleksi interferiraju sa redoks hemijom ćelija (1) direktno kroz metalne ili ligand redoks centre ili (2) indirektno vezivanjem za molekule uključene u redoks puteve. Iznenađujuće veliki broj lekova baziranih na metalima ima redoks deo u



svom mehanizmu delovanja. Pored organometalnih kompleksa rutenijuma, osmijuma i iridijuma<sup>145</sup>, ovaj mehanizam delovanja opisan je i za organokalajna(IV) jedinjenja<sup>144</sup>. Od 1972, kada je otkriveno da trifenilkalaj acetat usporava rast tumora kod miševa, veliki broj organokalajnih jedinjenja testiran je *in vitro* i *in vivo*. Varijacija liganada i organskih grupa omogućila je razvoj diorganokalajnih i triorganokalajnih(IV) jedinjenja sa snažnom antitumorskom aktivnošću<sup>146,147</sup>. Na toksičnost organokalajnih jedinjenja, opšte formule  $[R_4SnX_{4-n}]$  ( $n = 1-4$ ), utiče broj i priroda organskih grupa (R) vezanih za atom kalaja<sup>148</sup>. Maksimalnu biološku aktivnost poseduju triorganokalaji,  $[R_3SnX]$  (X = anjonski ligand). Toksičnost je delom posledica inhibicije oksidativne fosforilacije. Veruje se da stepen toksičnog delovanja kontrolišu interakcije sa aminokiselinama na određenim aktivnim mestima. Najverovatnija mesta su N-H i/ili S-H grupe. Anjonski ligand, X, uglavnom slabo utiče na toksičnost derivata kalaja<sup>148</sup>. Tetraorganokalajna jedinjenja su prekursori triorganokalaja; nakon metaboličke dealkilacije, kada se gubi jedna organska grupa, nastaju toksična triorganokalajna jedinjenja. Rastvorljivost ovih jedinjenja u vodi se smanjuje povećanjem broja i dužine organskih grupa, ali takođe zavisi i od određenog liganda<sup>148</sup>. Visok elektrofilni afinitet kalaja za tiole odgovoran je za inhibiciju tioredoksin reduktaze (TrxR)<sup>143,144,146</sup>. Prekomerna ekspresija tioredoksin reduktaza/tioredoxin sistema (TrxR/Trx) je povezana sa agresivnim rastom tumora i rezistencijom na tradicionalne terapijske agense, uključujući cisplatinu. Neutralizacija reaktivnih vrsti kiseonika nalazi se u osnovi protektivnog efekta tioredoksina od citotoksičnosti cisplatine<sup>149-152</sup>. Takođe, unutarćelijski redoks status predstavlja važan aspekt koji utiče na delovanje hemoterapeutika inhibitora tioredoksin reduktaze u terapiji melanoma, s obzirom na ulogu tioproteina u razvoju melanoma<sup>153,154</sup>. U skladu sa tim, farmakološka modulacija ekspresije TrxR/Trx sistema predstavlja racionalnu terapijsku strategiju prevazilaženja rezistencije ćelija kancera na cisplatinu<sup>149</sup>. Slaba rastvorljivost organokalajnih jedinjenja, delimično se rešava dodavanjem hidrofilnih grupa. Dok je hidroliza neophodna za aktivnost organokalajnih jedinjenja, lipofilnost organskih grupa kontroliše njihovu toksičnost. Formulacija i karakterizacija rastvora hidrofobnih lekova koji zavise od hidrolize, predstavlja poseban problem u razvoju lekova baziranih na jedinjenjima metala u terapiji kancera<sup>155</sup>.

## 1.7. Strategije dizajna lekova baziranih na jedinjenjima metala

Mnogi lekovi bazirani na jedinjenjima metala koji su trenutno na tržištu otkriveni su slučajno. Na bazi prve generacije slučajnih pogodaka, sledeće generacije lekova nastale su pažljivom analizom i delimičnim pretpostavkama mehanizma delovanja. Danas, oblast medicinske neorganske hemije teži ka racionalnijem procesu dizajna lekova<sup>131</sup>. Racionalni pristup dizajnu lekova baziranih na metalima se, u principu, ne razlikuje od dizajna lekova baziranih na malim organskim molekulima ili biološkim molekulima<sup>131</sup>. Prvi korak je identifikacija specifične molekulske mete povezane sa etiologijom bolesti zahvaljujući disciplinama kao što su genomika i proteomika. Nakon toga, uspostavljaju se sistemi za pretragu potencijalnih lekova testiranjem biblioteka jedinjenja (engl. *high-throughput screening*)<sup>131</sup>. Kako je proces pronalaženja leka generalno jako skup, važno je da se što ranije prepoznaju problematični kandidati. Najkritičnija tačka u tom pogledu odnosi se na termodinamičku i kinetičku stabilnost leka *in vivo*<sup>131,156</sup>. Farmakokinetičke osobine potencijalnih lekova definisane ADME konceptom - absorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija - snažno su povezane sa fizičko-hemijskim osobinama kao što su rastvorljivost, lipofilnost i stabilnost<sup>131</sup>. Isporuka lekova baziranih na jedinjenjima metala do ciljnog tkiva, predstavlja najveći izazov u hemoterapiji kancera. Jedna od strategija podrazumeva dizajn *pro-lekova*<sup>142</sup>. Uopšteno, metalni kompleksi mogu biti *pro-lekovi* koji se transformišu supstitucijom liganda i redoks procesima pre nego što dođu do ciljnog mesta<sup>145</sup>. *Pro-lekovi* su derivati lekova koji se transformišu *in vivo* u aktivne vrste, sa boljim fizičko-hemijskim i farmakokinetičkim osobinama<sup>142</sup>. Za mnoge komplekse, izazov je kontrola aktivacije supstitucijom (izmena liganda) i/ili redoks procesima kako bi se pokrenuo biološki odgovor u ciljnom tkivu<sup>145</sup>. Pored dizajna *pro-lekova*, proteklih godina akcenat je na dizajnu novih sistema za isporuku lekova, među kojima nanočestice imaju posebnu prednost za ciljanu isporuku lekova baziranih na metalima do tumorskih ćelija<sup>142</sup>.

## 1.8. Nanotehnologija i dizajn novih sistema za isporuku lekova

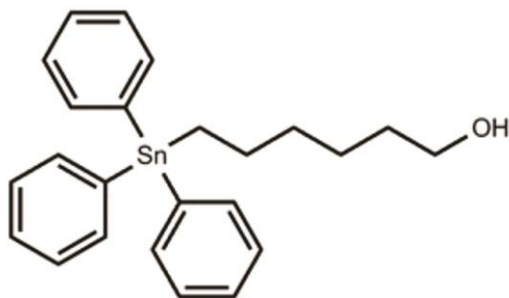
Oblast gde kvantna mehanika ima ulogu u razumevanju ponašanja materijala počinje od nanoskale. Manipulisanje materijalima ispod skale gde počinju da se preklapaju kvantno i klasično ponašanje smatra se nanonaukom<sup>157</sup>. Najznačajniji kriterijum ogromnog interesa za nanonauku leži u činjenici da mnogi materijali u nano opsegu imaju različite optičke, električne i fizičkohemijske osobine u poređenju sa istim materijalima klasičnih dimenzija. Lekovi pod oznakom nanotehnologije nemaju uvek kvantno ponašanje, ali interaguju sa biološkim komponentama na jedinstven način<sup>157</sup>. Nanomedicina, ogranak nanotehnologije, obuhvata širok spektar strategija u zdravstvenoj zaštiti, uključujući nanodijagnostiku, nanoterapeutike i nanomaterijale za farmaceutske primenu<sup>157</sup>. Nanočestice koje se koriste u farmaceutske svrhe se prema Enciklopediji farmaceutске tehnologije definišu kao čvrste koloidne čestice u rasponu veličine od 1 do 1000 nm<sup>158</sup>; *1–1000 nm* pravilo se zasniva na prefiksu *nano* koji označava jedan milijarditi deo metra<sup>157</sup>. Koriste se kao nosači lekova, u kojima je aktivni princip rastvoren, zarobljen ili inkapsuliran, ili za koji je aktivni princip adsorbovan ili vezan<sup>158</sup>. Među različitim novim sistemima za isporuku lekova, nanočestice su u ovom trenutku u fokusu kao nosači novih jedinjenja i lekova na tržištu. Većinu čine sistemi za pasivnu isporuku i klasifikovani su kao prva generacija nanoterapeutika. Ipak, i dalje se lome koplja da li je isporuka bolja opcija u poređenju sa otkrivanjem novih lekova, u pogledu vremena, novca i terapijske efikasnosti<sup>157</sup>. Ciljana isporuka lekova je od posebnog značaja u terapiji kancera, jer su hemoterapije uglavnom izuzetno toksične zbog nespecifičnog preuzimanja leka u zdravim ćelijama<sup>159</sup>. Pasivna akumulacija leka putem nanočestica, rezultat je propustljive vaskulature i smanjene limfne funkcije u tumoru, tzv. EPR efekta (engl. *enhanced permeability and retention effect*)<sup>160</sup>. EPR efekat je otkriven tokom istraživanja leka neokarzinostatina konjugovanog za poli(stiren-*ko*-maleinsku) kiselinu (SMANCS), namenjenog za terapiju kancera<sup>161</sup>. Ovaj fenomen je predstavljao novi koncept u hemoterapiji kancera, prema kome je veličina makromolekularnog terapeutika odgovorna za akumulaciju leka u tumorskom tkivu. Dugogodišnji koncept *magičnog metka* napravio je iskorak uvođenjem pasivne ciljane isporuke, smanjenjem toksičnosti i povećanjem odgovora na lek u terapiji kancera<sup>157</sup>. Aktivna ciljana isporuka leka postiže se funkcionalizacijom nanočestica specifičnim ligandima (folna kiselina, transferin, manozna, monoklonska antitela, aptameri) koji se vezuju za prekomerno

ekspimirane receptore na tumorskim ćelijama<sup>162</sup>. Primarna uloga liganda je da pospeši preuzimanje leka u tumorskim ćelijama, odnosno redukuje akumulaciju u normalnom tkivu<sup>159</sup>. Mnogi lekovi ostaju na nivou prekliničkih ispitivanja zbog neodgovarajućih fizičko-hemijskih osobina, nestabilnosti ili neželjenih efekata. Čak i ako se prevaziđu ovi nedostaci, nije garantovana klinička primena velikog broja jedinjenja zbog faktora koji utiču na farmakokinetičke osobine leka<sup>157</sup>. U tom kontekstu, nosač se primenjuje u slučaju fizičko-hemijske ili metaboličke nestabilnosti leka, slabe rastvorljivosti u vodi, toksičnosti, nedovoljne koncentracije u ciljnom tkivu, velikog volumena distribucije i brzog klirensa<sup>157,163</sup>. Mononuklearni fagocitni sistem je glavni mehanizam uklanjanja nanočestica u cirkulaciji<sup>157</sup>. Hidrofilno oblaganje čestica, površinskom modifikacijom polietilen glikolom (PEG), sprečava ili odlaže adheziju opsonina na česticama. Time se izbegava prepoznavanje fagocitnim sistemom, odnosno produžava vreme u cirkulaciji. Sterna stabilizacija, koju kreira PEG na površini nanočestica, minimizira nespecifične interakcije, čime se sprečava agregacija čestica i gubitak na neželjenim mestima<sup>157,164</sup>. Nanotehnologije u terapiji kancera obuhvataju injektabilne nanovektore za isporuku lekova, kontrastne agense za prikaz magnetnom rezonancijom<sup>165</sup> i nove metode bazirane na nanočesticama za specifičnu detekciju DNK i proteina<sup>166</sup>. Lipozomi predstavljaju arhetipsku, najjednostavniju forma nanovektora. Doksorubicin inkapsuliran u PEG-liposome (*Doxil*®) odobren je pre dvadeset godina za terapiju Kapošijevog sarkoma, a danas se primenjuje u terapiji kancera dojki i refraktornog kancera ovarijuma<sup>167</sup>. U kliničkim studijama je već pokazano da lipozomske forme cisplatine (*Lipoplatin*®) i oksaliplatine (*Lipoxal*®) značajno redukuju toksični efekat ovog leka<sup>131</sup>. Konjugati polimer-lek, vrlo često se smatraju novim hemijskim entitetima zahvaljujući različitom farmakokinetičkom profilu u odnosu na slobodni lek<sup>162</sup>. Lekovi bazirani na metalima vezani za polimerne nanočestice trenutno u kliničkim ispitivanjima za terapiju kancera uključuju konjugat *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamid polimera i diaminocikloheksan platina kompleksa (*ProLindac*®) i cisplatinu inkapsuliranu u PEG-PGlu micelle koje se sastoje od PEG i poli( $\gamma$ -benzil-L-glutamata) (*Nanoplatin*®)<sup>162,164,168</sup>. Jedini lek baziran na metalima dizajniran za aktivnu isporuku u kliničkim ispitivanjima je oksaliplatina inkapsulirana u lipozom za koji je vezan humani transferin kao specifični ligand (MBP-426)<sup>164</sup>. Silika predstavlja zanimljivog kandidata za nanovektora. Porozna silika je biodegradabilna, sa kinetikom oslobađanja leka koja je značajno brža u poređenju sa

biodegradabilnim polimerima<sup>167</sup>. Mezoporozne nanočestice silike (engl. *mesoporous silica nanoparticles*, MSN), kao što su silika MCM-41 (engl. *Mobil Composition of Matter No. 41*) i SBA-15 (engl. *Santa Barbara Amorphous-15*), su čvrsti materijali različitog oblika i jedinstvene porozne strukture nalik saćama koje sadrže stotine kanala - mezopora<sup>169,170</sup>. Uopšteno, mezoporozni materijali su izvedeni od supramolekulskih oblika surfaktanata, koji formiraju templat za neorgansku komponentu tokom sinteze<sup>171</sup>. Kada se surfaktant ukloni, najčešće pirolizom ili odgovarajućim rastvaračem, matriks mezoporozne silike je potencijalni nosač za lekove sa jedinstvenim karakteristikama, kao što su velika kontaktna površina i zapremina pora, što takođe podrazumeva visok potencijal za adsorpciju lekova. Uređena mreža pora homogene veličine dozvoljava finu kontrolu vezivanja leka i kinetike oslobađanja<sup>172</sup>. Zatim, preuzimanje terapeutika putem nanonosaa omogućava alternativni put difuzije lekova u ćeliju, čime se zaobilazi aktivnost MDR transportera (engl. *multiple-drug resistance*), koji su delom odgovorni za rezistenciju na hemoterapiju<sup>162,173</sup>. Visok kapacitet za adsorpciju značajno povećava koncentraciju leka u ćeliji, čak i kada je preuzimanje nanočestica limitirano, zbog čega su MSN višestruko uspešniji od lipozoma u terapiji rezistentnih kancera<sup>174</sup>. Zbog brojnih mogućnosti za dodatnu funkcionalizaciju, prednost ovih sistema je isporuka terapeutskih agenasa sa komplementarnim ili sinergističkim efektom<sup>175,176</sup>. Primenjuju se za isporuku hidrofobnih lekova<sup>177</sup> i kontrolisano, *pametno*, oslobađanje leka, putem mehanizama koji koriste promene redoks stanja ili pH prilikom prelaska čestice iz vanćelijskog prostora u ćeliju<sup>159</sup>. Zbog brojnih silanol grupa, mezoporozne strukture i relativno jednostavne sol-gel sintetske metode, silika predstavlja matriks za integrisanje drugih nanočestica (nanokompoziti), kako bi se povećala stabilnost i biokompatibilnost nanočestica<sup>178</sup>. Multifunkcionalni nanokompoziti bazirani na mezoporoznim česticama silike mogu da integrišu više agenasa u jednu silika nanočesticu za simultanu terapiju i dijagnozu (engl. *targeted theranostics*), zbog čega se smatraju *magičnim metkom*, jer bi jedna doza omogućila efikasnu, netoksičnu i minimalno invazivnu terapiju<sup>170,179</sup>. Na putu ka tome, FDA je odobrila klinička ispitivanja ekstremno malih nanočestica silike (engl. *Cornell dots*) za ciljanu dijagnostiku metastatskog melanoma<sup>180</sup>.

## 1.9. Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ uskladištenog u SBA-15 mezoporozni materijal

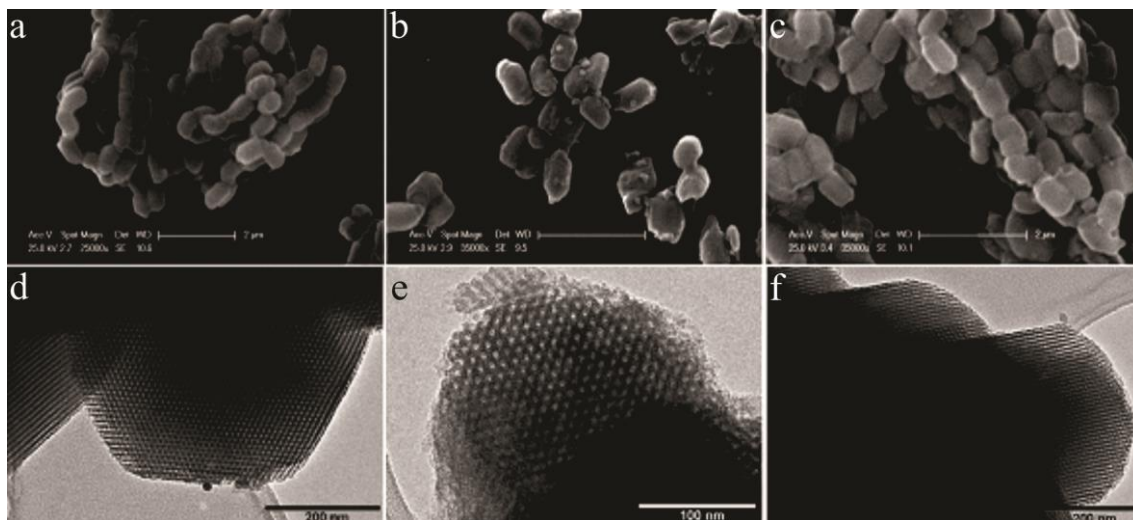
Kaluđerović i saradnici su već pokazali da skladištenje citotoksičnih derivata titanocena u mezoporozne nanomaterijale povećava njihovu aktivnost u tumorskim ćelijama<sup>181</sup>. Kako je pokazano da trifenilkalaj(IV) jedinjenja poseduju veću aktivnost u poređenju sa derivatima titanocena i cisplatinom<sup>181-183</sup>, kao i zbog veće citotoksičnosti jedinjenja titanijuma skladištenih u SBA-15 siliku u poređenju sa nosačem MCM-41<sup>181</sup>, u ovoj studiji je ispitivan terapijski potencijal organokalajnog(IV) jedinjenja 6-[trifenilstanil]-1-heksanola,  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ , nanešenog na nanostrukturni materijal SBA-15 (Slika 6).



Slika 6 | **Organokalajno(IV) jedinjenje 6-[trifenilstanil]-1-heksanol.** Iz Bulatović et al. 2014. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53:5982-7.

SBA-15 je sintetisan sol-gel metodom, dok su SBA-15p čestice funkcionalizovane kovalentnim vezivanjem 3-hloropropiltrioksilana (CPTS) za SBA-15<sup>184</sup>. Morfološka analiza na nivou skenirajuće (SEM) i transmisione elektronske mikroskopije(TEM)<sup>184</sup>, nije pokazala značajniju razliku između SBA-15 i SBA-15p čestica, što ukazuje da funkcionalizacija nije uticala na morfologiju materijala. SBA-15pSn čestice su dobijene skladištenjem  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  u SBA-15p<sup>184</sup>. Kao što je očekivano, veličina pora SBA-15pSn (4.80 nm) je manja od veličine pora SBA-15p (4.88 nm) i SBA-15 (4.97 nm). Mala količina  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  se nalazi na spoljašnjoj površini materijala. SEM i TEM mikrofografije SBA-15pSn prikazuju uniformnu morfologiju nanostrukturnih štapića i uniformnu veličinu pora heksagonalnog oblika. Distribucija veličine SBA-

$^{15}\text{pSn}$  čestica određena je na nivou SEM<sup>184</sup>, nakon čega je izračunata prosečna veličina čestice 720×460 nm (Slika 7).



Slika 7 | **SBA-15** čestice na nivou (a-c) SEM i (d-f) TEM. a i d | SBA-15, b i e | SBA-15p, c i f | SBA-15pSn. Iz Bulatović et al. 2014. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*53:5982-7.

U skladu sa svim navedenim, bilo je interesantno da se ispita antitumorski potencijal novosintetisanog jedinjenja baziranog na kalaju u slobodnoj formi i nanešenog na SBA-15 mezoporozni materijal u model sistemu mišjeg melanoma *in vitro* i *in vivo*. Prednost singenog *in vivo* modela je u tome što uključuje i uticaj ćelija imunskog sistema, koji je deficijentan u ksenograft modelima. U svetlu činjenice da je heterogenost melanoma velika, kao i da bi se eliminisala specifičnost vrste, efikasnost eksperimentalnih agenasa će biti ispitivana i na visoko invazivnoj humanoj ćelijskoj liniji A375.

## 2. CILJEVI



Organokalajna jedinjenja su već dugi niz godina u fokusu istraživanja lekova baziranih na jedinjenjima metala, zahvaljujući visokom antitumorskom potencijalu *in vitro* i *in vivo*. Sa druge strane, slaba rastvorljivost u vodi ograničava kliničku primenu ove grupe metalnih jedinjenja. Dizajn biokompatibilnih nanočestica silike za dijagnozu i terapiju predstavlja najperspektivniju oblast nanomedicine. Nanočestice silike sa jedinstvenom mezoporoznom strukturom imaju prednost u odnosu na tradicionalne nanosisteme za ciljanu isporuku različitih terapijskih agenasa, posebno u terapiji kancera. Prednost MSN nanovektora je, između ostalog, isporuka hidrofobnih lekova, što ih čini idealnim nosačem za ovaj tip metalnih jedinjenja.

Na osnovu svega navedenog postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Ispitivanje antitumorskog delovanja  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  i SBA-15pSn, na ćelijskim linijama melanoma B16 poreklom od miša i A375 poreklom od čoveka *in vitro*.
2. Određivanje mehanizama preuzimanja SBA-15pSn na A375 ćelijskoj liniji humanog melanoma.
3. Analiza molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi antitumorskog delovanja  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  i SBA-15pSn, u modelu mišjeg i humanog melanoma *in vitro*.
4. Ispitivanje terapijskog potencijala  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  i SBA-15pSn, u modelu mišjeg melanoma *in vivo*.

### 3. MATERIYAL I METODE

### 3.1. Reagensi i rastvori

Medijum za gajenje ćelija RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*), goveđi fetalni serum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (PAA Laboratories, Pašing, Austrija); jugocilin, streptomycin-sulfat, nistatin (Galenika, Beograd, Srbija); tripsin, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), RNAza, propidijum jodid (PI), dimetil sulfoksid (DMSO), ditiotreitrol (DTT), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), Triton X-100, Tween-20, aprotinin, bromfenol plavo, glutaraldehid (GA), osmijum tetraoksid ( $\text{OsO}_4$ ), 3,4-dihidroksi- L-fenilalanin (L-dopa), 5(6)-karboksifluorescein diacetat *N*-sukcinimidil estar (CFSE), 3-metiladenin (3-MA), natrijum azid ( $\text{NaN}_3$ ) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD); dinatrijum hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) (Merck, Darmštat, Nemačka); natrijum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Carlo Erba, Milano, Italija); kalijum natrijum tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); natrijum dihidrogenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) (Analytika, Prag, Češka); natrijum hlorid ( $\text{NaCl}$ ) (ICN, Aurora, SAD); glicerol, natrijum hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), kalijum dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), kalijum hlorid ( $\text{KCl}$ ) (LachNer, Neratovice, Češka); bakar sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), kalcijum hlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), sirćetna kiselina, metanol, etanol, ksilol (Zorka, Šabac, Srbija); tripan plavo, goveđi albumin iz seruma (engl. *bovine serum albumine*, BSA), Tris, Araldit epoksidna smola (Fluka, Selze, Nemačka); kristal violet, Folin-Ciocalteu reagens (Mol, Beograd, Srbija); akridin oranž (Labo-Moderna, Pariz, Francuska); *blotto* nemasno mleko u prahu (engl. *blotto non-fat dry milk*) (ChemCruz Biochemicals, Santa Kruz, SAD); 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat (DAF-FM diacetat), fluorescein di- $\beta$ -D-galaktopiranozid (FDG), dihidrorodamin 123 (DHR) (Molecular Probes, Judžin, SAD); HEPES (Flow Laboratories, Irvin, Velika Britanija); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT), amonijum persulfat (APS), natrijum dodecil sulfat (SDS),  $\beta$ -merkaptioetanol, saharoza (AppliChem, Darmštat, Nemačka); *N,N,N',N'*-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED), paraformaldehid (PFA), glicin, akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka); ECL reagens za detekciju (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija); Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija); Eozin Y (Molar Chemicals, Budimpešta, Mađarska); glicergel (Dako, Glostrup, Danska); ApoStat (R&D Systems, Mineapolis, SAD); aneksin V-FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate*) (BD Pharmingen, San Dijego, SAD).

Korišćena su sledeća antitela: anti p-Akt, anti Akt, anti p-p70S6K, anti p70S6K, anti p-ERK1/2, anti ERK1/2, anti p-p38, anti p38, anti p-SAPK/JNK, anti SAPK/JNK (Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD); anti  $\beta$ -katenin, anti *Notch* 1, anti Okt-3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX, SAD); anti  $\beta$ -aktin (Abcam, Kembridž, Velika Britanija); anti CD271-FITC (Miltenyi Biotec, Bergiš Gladbah, Nemačka); anti kunić IgG-HRP (engl. *horseradish peroxidase*) (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija).

Ćelijske linije melanoma su gajene u RPMI 1640 medijumu sa HEPES (20 mM), L-glutaminom (2mM), 10% FBS, antibioticima jugocilin (100 IJ/mL) i streptomycin-sulfat (0.25 mg/mL) i antimikotikom nistatin (100 IJ/mL). Pre dodavanja u medijum, FBS je inkubiran 30 minuta na 56 °C, kako bi se inaktivirale komponente komplemeta. Za ispiranje ćelija korišćen je PBS pufer (engl. *phosphate buffered saline*) pH 7.4 sledećeg sastava: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O i 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Za bojenje ćelija aneksin V-FITC korišćen je pufer za vezivanje aneksina (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). Za merenje koncentracije proteina metodom po Loriju pravljeni su sledeći rastvori: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0.1 M NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O i 2% K-Na-tartarat u destilovanoj vodi (dH<sub>2</sub>O), mešani u razmeri 98:1:1. Za imunoblot analizu pravljeni su sledeći rastvori: 5 × PBS bez kalijuma (400 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 500 mM NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O u dH<sub>2</sub>O); rastvor za liziranje ćelija (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol i 50 mM DTT u dH<sub>2</sub>O) koji je neposredno pre upotrebe suplementiran inhibitorima proteaza (10 µg/mL aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF); standardni pufer za nalivanje na gel za elektroforezu, 4 × Laemmli pufer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% SDS, 20% glicerol, 0.2 M  $\beta$ -merkaptotanol, 0.004% bromfenol plavo); 5 × pufer za elektroforezu (125 mM Tris, 0.5% SDS, 1.25 M glicin u dH<sub>2</sub>O); pufer za transfer na membranu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10% metanol, 0.1% SDS u dH<sub>2</sub>O); za pranje membrana korišćen je rastvor 0.1% Tween 20-PBS (PBSTw); nespecifično vezivanje antitela blokirano je 5% BSA ili mlekom u prahu u 0.1% PBSTw; rastvori antitela odgovarajućeg razblaženja pravljeni su u 0.1% PBSTw sa 1% BSA ili 3% mleka u prahu. Rastvor [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] u DMSO čuvan je na -20 °C, u koncentraciji 20 mM. Rastvori SBA-15p (1mg/mL), SBA-15pSn (1mg/mL) i cisplatine (10 mM) pravljeni su u medijumu za gajenje neposredno pre upotrebe.

## 3.2. Kulture ćelija

### 3.2.1. B16 linija mišjeg melanoma

B16 ćelijska linija je izvedena pre više od 60 godina iz hemijski indukovanog tumora u C57BL/6 miševima. Zbog izražene pigmentacije, mnogi istraživači preferiraju ovu liniju kao model za melanom. Glavni nedostatak B16 linije mišjeg melanoma je što profili adhezije, faktori rasta, invazija, antiapoptotski mehanizmi, sposobnost ćelija da nadvlada imunski sistem i druga obeležja ćelija kancera ne reflektuju humanu bolest<sup>185</sup>. Analiza genetičkih promena u B16F0 ćelijskoj liniji spontanog mišjeg melanoma, koja ima slab metastatski potencijal, pokazala je da ne postoje mutacije u *Braf* i *Ras* genu, zatim eksprimiraju PTEN i p53, što ukazuje da inaktivacija ovih tumor supresora nije uključena u razvoj mišjeg melanoma. Sa druge strane, B16 ćelije ne eksprimiraju p16<sup>Ink4a</sup> i p19<sup>Arf</sup> tumor supresore, kao posledica delecija u *CdkN2A* lokusu<sup>186</sup>. B16 linija mišjeg melanoma korišćena u ovoj studiji, potiče iz Američke kolekcije kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC) (Manasas, VA, SAD), i dobijena je na poklon od dr Siniše Radulovića (Institut za onkologiju i radiologiju, Beograd, Srbija).

### 3.2.2. A375 linija humanog melanoma

Amelanotična A375 ćelijska linija potiče od pacijenta sa malignim melanomom<sup>187</sup>. Ovu liniju sačinjava heterogena populacija ćelija redukovanog metastatskog potencijala, sa subpopulacijom visoko metastatskih ćelija<sup>188</sup>. Indukovanjem relativno malog broja plućnih metastaza iz roditeljske A375 linije (A375P), moguće je selektovati visoko metastatske A375M ćelije (M1, M2 i SM)<sup>189</sup>. V<sup>600E</sup>BRAF stimuliše konstitutivnu ERK aktivaciju u A375 ćelijskoj liniji<sup>190</sup>. A375 linija humanog melanoma potiče iz ATCC, i poklon je profesora Ferdinanda Nicolletija (Univerzitet u Katanji, Sicilija, Italija).

### 3.2.3. Gajenje ćelija u kulturi

Ćelije su gajene u sterilnim plastičnim flašicama - falkonima (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>, na temperaturi od 37 °C. Za evaluaciju vijabiliteta, u sterilne plastične ploče sa 96 bunarića ravnog dna (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) sađeno je 5 x 10<sup>3</sup> ćelija u 100 µL medijuma za gajenje. Za analizu

na nivou svetlosne mikroskopije, ćelije su ravnomerno sađene na sterilnim staklenim mikroskopskim pločicama sa 8 komorica (Nalge Nunc International, Ročester, NY, SAD) u gustini od  $1.5 \times 10^4$  ćelija/bunariću u 200  $\mu$ L medijuma za gajenje. U svim ostalim eksperimentima, u sterilne plastične ploče sa 6 bunarića ravnog dna (Sarstedt, Nimbreh, Nemačka) sađeno je  $1.5 \times 10^5$  ćelija u 1 mL medijuma za gajenje. Kulture su inkubirane preko noći, nakon čega su dodavani rastvori jedinjenja do finalne zapremine od 200  $\mu$ L za ploče sa 96 bunarića, 400  $\mu$ L za mikroskopske pločice, odnosno 2 mL za ploče sa 6 bunarića i kultivisane kako je naznačeno u eksperimentima.

### **3.3. Eksperimentalne životinje**

U ovoj studiji korišćeni su miševi ženskog pola soja C57BL/6 starosti 6-8 nedelja. Miševi su dobijeni iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalne životinje su čuvane pod standardnim uslovima sa neograničenim pristupom vodi i hrani. Svi *in vivo* eksperimenti odobreni su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, rešenje broj 1-02/14.

### **3.4. Metode**

#### **3.4.1. Tripsinizacija ćelija**

Na osnovu vizuelne procene da su kulture adherentnih ćelijskih linija melanoma B16 i A375 dostigle 70% konfluentnosti, postupkom tripsinizacije odlepljivane su sa podloge. Medijum za gajenje je uklanjan, a ćelije su ispirane u PBS. Za odlepljivanje ćelija korišćen je 0.25% tripsin - 0.02% EDTA rastvor u PBS. Tripsinizacija je zaustavljena dodavanjem svežeg medijuma za gajenje. Suspenzija ćelija je centrifugirana 3 minuta na 2000 rpm. Ćelijski talog je resuspendovan u medijumu za gajenje, nakon čega je određivan broj vijabilnih ćelija.

#### **3.4.2. Tripin plavo test**

Za određivanje broja vijabilnih ćelija u suspenziji korišćen je 0.1% rastvor boje tripan plavo u PBS. Tripin plavo test se zasniva na principu da žive ćelije poseduju membranu

očuvanog integriteta koja ne propušta boje, tako da selektivno boji plavo mrtve ćelije<sup>191</sup>. Suspenzija ćelija mešana je sa rastvorom boje u odnosu 1:1. Ćelije su brojane pod Leica DM IL svetlosnim mikroskopom (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) u komori po Türker-Bürku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po mL suspenzije računat je po obrascu: broj ćelija/broj polja/faktor razblaženja  $\times 10^6$ . Na osnovu izračunatog broja, razblaživanjem suspenzije podešavana je gustina ćelija za dalji ekperimentalni rad.

### 3.4.3. Testovi vijabiliteta

#### 3.4.3.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijski test koji se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) u formazan, narastvorljivi derivat ljubičaste boje<sup>192</sup>. NAD(P)H-zavisna redukcija ove boje reflektuje broj vijabilnih ćelija. Ćelije su inkubirane u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p tokom 72 h, nakon čega je supernatant odlivan, a kulturama je dodavano 50  $\mu\text{L}$  rastvora MTT boje u medijumu za gajenje (0.5 mg/mL). Ćelije su potom inkubirane 30 minuta, nakon čega su kristali formazana rastvarani u 50  $\mu\text{L}$  DMSO. Intenzitet boje određivan je merenjem apsorbancije svetlosti na 540 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB, Beč, Austrija). Rezultati vijabiliteta prikazivani su kao procenat vrednosti apsorbancije kontrolne kulture gajene u medijumu.  $\text{IC}_{50}$  (engl. *half maximal inhibitory concentration*) vrednost jedinjenja, definisana je kao koncentracija koja dovodi do 50% inhibicije rasta *in vitro*.  $\text{MC}_{50}$  vrednost, označava masenu koncentraciju jedinjenja izraženu u  $\mu\text{g/mL}$ , koja dovodi do 50% inhibicije vijabiliteta *in vitro*.

#### 3.4.3.2. Kristal violet test

Kristal violet test je kolorimetrijski test koji se zasniva na vezivanju bazne boje kristal violet za negativno naelektrisane polisaharide, proteine i nukleinske kiseline. Količina boje koja se veže proporcionalna je broju ćelija na osnovu čega se procenjuje vijabilitet u kulturi<sup>193</sup>. Ćelije su inkubirane u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn, SBA-15p ili 3-metiladenina (3-MA) tokom 72 h, nakon čega je supernatant odlivan, a ćelije fiksirane za podlogu 4% paraformaldehidom i bojene 1% rastvorom kristal violeta u PBS. Višak boje je uklanjnjan ispiranjem bunarića tekućom vodom, a vezana boja je rastvarana u 50

$\mu\text{L}$  33% sirćetne kiseline. Apsorbancija svetlosti merena je na 540 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Rezultati vijabiliteta su prikazivani kao procenat vrednosti apsorbcije kontrolne kulture gajene u medijumu.

### 3.4.4. Protočna citofluorimetrija

Protočna citometrija i ćelijsko sortiranje aktivirano fluorescencijom (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) predstavljaju brzu i pouzdanu metodu za karakterizaciju i izolaciju određenih ćelijskih subpopulacija baziranu na fluorescentnom obeležavanju. Pojedinačnim ćelijama, obeleženim konvencionalnim imunofluorescentnim tehnikama, analizira se fluorescencija i intenzitet svetlosti rasejane pod malim uglom, prilikom prolaska kroz laserski snop. Ova dva parametra karakterišu ćelijsku populaciju, tako da je klasifikacija ćelija objektivnija u poređenju sa fluorescentnom mikroskopijom<sup>194</sup>.

Za analizu obeleženih uzoraka korišćeni su FACSCalibur (Becton Dickinson, Frenklin Lejks, NJ, SAD) ili CyFlow Space (Partec, Minster, Nemačka) protočni citofluorimetri. Intenzitet fluorescencije analiziran je u softverskom programu CellQuestPro, odnosno FloMax. Ekscitacioni i emisioni maksimumi fluorescentnih boja prikazani su u Tabeli 1.

**Tabela 1** | Fluorescentne boje korišćene u eksperimentalnom radu

Fluorescentna boja	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)
PI	535	617
FITC	495	519
AO	475	590
CFSE	492	517
FDG	490	514
DHR	507	528
DAF-FM diacetat	495	515

$\lambda_{\text{ex}}$  - talasna dužina maksimuma apsorpcije;  $\lambda_{\text{em}}$  - talasna dužina maksimuma emisije



#### 3.4.4.1. Analiza ćelijskog ciklusa

Za analizu distribucije ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa, B16 i A375 ćelije su tretirane IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn. Nakon 72 h, supernatanti su sakupljeni u epruvete i kasnije spajani sa odgovarajućom suspenzijom ćelija sakupljenih tripsinizacijom. Suspenzije ćelija su ispirane dva puta u hladnom PBS i centrifugirane 3 minuta na 2000 rpm. Ćelije su potom fiksirane u 70% etanol-PBS preko noći na 4 °C. Fiksiranjem se permeabilizuje ćelijska membrana, čime je omogućeno unutarćelijsko bojenje. Fiksirane ćelije su dva puta ispirane u PBS, i inkubirane u rastvoru propidijum jodida (PI) (20 µg/mL) i RNaze (0.1 mg/mL) u PBS, 45 minuta na 37 °C u mraku. PI interkalira ravnomerno u dvostruki heliks DNK, što označava da je količina vezane boje proporcionalna količini DNK. Dvolančana RNK, koju PI takođe obeležava, uklanja se dodavanjem RNaze. Razvrstavanje ćelija po fazama ćelijskog ciklusa<sup>195</sup>, analizirano je u CellQuestPro ili FloMax softverskom programu.

#### 3.4.4.2. Analiza stope ćelijskih deoba

Proliferacija ćelija određivana je obeležavanjem ćelija CFSE fluoroforom. CFSE nastaje nakon hidrolize acetil grupa karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estra, koji vrlo lako difunduje kroz ćelijsku membranu. Posredstvom sukcinimidil grupa kovalentno se vezuje za amine, prvenstveno lizinske ostatke, čime se obeležavaju proteini citoplazme. Nakon deobe, ćerke ćelije nasleđuju istu količinu boje, tako da intenzitet fluorescencije po ćeliji postaje dvostruko slabiji<sup>196,197</sup>.

Odmah nakon tripsinizacije, ćelije (5 x 10<sup>6</sup>/mL) su resuspendovane u 1 mL 0.1% FBS-PBS i inkubirane sa 1 µM CFSE bojom 10 minuta na 37 °C. Boja koja nije difundovala kroz ćelijsku membranu i vezala se za proteine citoplazme uklanjana je ispiranjem ćelija u PBS. Ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn tokom 96 h, sakupljane tripsinizacijom i ispirane u PBS. Zelena fluorescencija analizirana je u FloMax programu.

### 3.4.4.3. Detekcija ćelija u apoptozi

U ranim fazama apoptoze, fosfatidil serin koji je normalno smešten u citoplazmatičnom sloju ćelijske membrane, premešta se u spoljašnji sloj. Premeštanje fosfatidil serina omogućava detekciju fluorescentno obeleženim rekombinantnim aneksinom V (aneksin V-FITC), proteinom koji se vezuje za fosfolipide i ima snažan afinitet prema fosfatidil serinu<sup>198</sup>. Kontrastnim bojenjem PI, moguće je razlikovati ćelije u ranoj apoptozi od kasno apoptotskih/nekrotskih ćelija<sup>195</sup>.

Ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}/MC_{50}$  dozom  $Ph_3Sn(CH_2)_6OH$  ili SBA-15pSn tokom 72 h. Po završetku tretmana, supernatanti su sakupljeni i kasnije spajani sa suspenzijom ćelija sakupljenih tripsinizacijom. Ćelije su ispirane u PBS i resuspendovane u 100  $\mu$ L pufera za vezivanje aneksina kome je dodavano 1.5  $\mu$ L aneksin V-FITC i 1.5  $\mu$ L PI (1 mg/mL). Ćelije su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a bojenje je prekidano dodavanjem 200  $\mu$ L pufera za vezivanje aneksina. Intenzitet fluorescencije je analiziran u CellQuestPro ili FloMax softverskom programu.

### 3.4.4.4. Detekcija aktivnosti kaspaza

Za detekciju aktiviranih formi kaspaza korišćen je fluorescentno obeležen pan-kaspazni inhibitor Z-VAD-fmk (ApoStat). Ćelije su inkubirane 72 h u prisustvu  $Ph_3Sn(CH_2)_6OH$  ili SBA-15pSn. Supernatanti su spajani sa odgovarajućom suspenzijom ćelija koje su sakupljene tripsinizacijom. Ćelije su potom ispirane u PBS, centrifugirane 3 minuta na 2000 rpm i resuspendovane u 100  $\mu$ L 5% FBS-PBS kome je dodavan 1  $\mu$ L ApoStat. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C, ćelije su ispirane i resuspendovane u 300  $\mu$ L PBS. Fluorescencija je analizirana u CellQuestPro ili FloMax softverskom programu.

### 3.4.4.5. Detekcija autofagije

Autofagija je odgovorna za održavanje ćelijske homeostaze kontinuiranim prometom proteina i organela u lizozomima. Citosolne komponente se pre degradacije autofagijom u lizozomima najpre odvajaju u vezikule sa dvostrukom membranom - autofagozome. Farmakološka inhibicija ovog procesa postiže se tretmanom 3-MA, inhibitorom PI3K, koja je esencijalna za inicijaciju autofagije<sup>199-201</sup>. Akridin oranž (AO) je boja koja se sa

visokim afinitetom vezuje za kisele vezikule u citoplazmi. U zavisnosti od zapremine i kiselosti autofagozoma, emituje svetlost u crvenom delu spektra. Ukoliko se veže za DNK, akridin oranž emituje zelenu svetlost.

Ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}/MC_{50}$  dozom  $Ph_3Sn(CH_2)_6OH$  ili SBA-15pSn tokom 72 h, nakon čega su kulture ispirane u PBS, a ćelije sakupljane tripsinizacijom i bojene AO (1  $\mu g/mL$ ) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Ispiranjem ćelija u PBS uklanjan je višak boje. Zelena i crvena fluorescencija, očitavane na FL1 odnosno FL3 kanalu, analizirane su u CellQuestPro ili FloMax softverskom programu.

#### **3.4.4.6. Detekcija unutarćelijske produkcije azot oksida**

Za kvantifikaciju azot oksida (NO) u ćelijama, korišćen je indikator DAF-FM diacetat. Zahvaljujući acetil grupama, DAF-FM diacetat lako difunduje kroz ćelijsku membranu i transformiše se u rastvorljivi DAF-FM aktivošću esteraza u citoplazmi, gde reaguje sa NO kada nastaje fluorescentni derivat triazola<sup>202</sup>.

Ćelije su inkubirane sa  $IC_{50}/MC_{50}$  dozom  $Ph_3Sn(CH_2)_6OH$  ili SBA-15pSn 72 h, ispirane 2 puta u PBS i inkubirane 1 h na 37 °C u 5  $\mu M$  rastvoru DAF-FM diacetata u medijumu za gajenje bez fenol crvene boje. Ćelije su potom ispirane u PBS i inkubirane dodatnih 15 minuta na 37 °C u medijumu bez fenol crvene boje i bez seruma, kako bi se završila reakcija deesterifikacije. Očitane vrednosti zelene fluorescencije analizirane su u Partec FloMax programu.

#### **3.4.4.7. Detekcija produkcije reaktivnih vrsti kiseonika i azota**

Dihidrorodamin 123 (DHR), indikator produkcije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsti, pasivno difunduje kroz ćelijsku membranu i oksiduje se u fluorescentnu boju rodamin 123 (R123)<sup>203</sup>.

Ćelijske kulture su inkubirane 20 minuta na 37 °C u 4  $\mu M$  rastvoru DHR u medijumu za gajenje, koji je finalno razblaživan do 1  $\mu M$  rastvora dodavanjem  $Ph_3Sn(CH_2)_6OH$  ili SBA-15pSn. Nakon 72 h, ćelije su sakupljane tripsinizacijom i ispirane dva puta u PBS. Intenzitet zelene fluorescencije analiziran je u Partec FloMax programu.

#### 3.4.4.8. Detekcija aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze

Aktivnost beta-galaktozidaze povezane sa senescencijom (engl. *senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity*), omogućava identifikaciju senescentnih ćelija u kulturi. Aktivnost SA- $\beta$ -gal rezultat je povećane ekspresije klasičnog lizosomalnog enzima. Lizosomalna  $\beta$ -D-galaktozidaza je hidrolaza koja iseca terminalnu  $\beta$ -galaktozu ganglioziida i drugih glikokonjugata<sup>204,205</sup>. Fluorescein di- $\beta$ -D-galaktopiranozid (FDG) je fluorogeni supstrat  $\beta$ -galaktozidaze. Hidroliza galaktozil ostatka prevodi FDG najpre u fluorescein monogalaktozid (FMG), a zatim u fluorescein koji nakon ekscitacije emituje zelenu fluorescenciju.

Ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn 96 h, nakon čega su kulture ispirane u PBS, a ćelije sakupljane tripsinizacijom. Ćelijska suspenzija u medijumu za gajenje je mešana sa istom zapreminom 2mM rastvora FDG u sterilnoj dejonizovanoj vodi i inkubirana 1 minut na 37 °C. Hipotonični rastvor permeabilizuje ćelije, što olakšava ulazak FDG. Nakon inkubacije, suspenzija je razblaživana 10 puta u ledeno hladnom medijumu za gajenje. Pre merenja uzorci su držani na 4 °C tokom 30 minuta, kako bi se smanjio izlazak fluoresceina iz ćelija. Dobijeni podaci su analizirani u FloMax programu.

#### 3.4.4.9. Detekcija ekspresije membranskog CD271 receptora

CD271 (engl. *Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor, LNGFR*), eksprimiraju stem ćelije nervne kreste (engl. *neural crest stem cells, NCSCs*). Takođe, impliciran je i kao marker ranih stadijuma razvića Švanovih ćelija<sup>206,207</sup>.

Kultura A375ćelija je inkubirana u prisustvu IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> doze Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn tokom 72 h. Ćelije su ispirane u PBS i odlepljivane sa podloge primenom jakog mlaza hladnog 1 mM rastvora EDTA u PBS. Suspenzija ćelija je još jednom ispirana, nakon čega su ćelije ostavljane 1 h na sobnoj temperaturi u medijumu za gajenje kako bi se rekonstituisala membrana. Ćelije su ispirane u 0.5% BSA-PBS, a zatim inkubirane 10 minuta na 4 °C u mraku sa FITC-obeležanim humanim monoklonskim CD271 antitelom produkovanim u mišu u 2 mM EDTA - 0.5% BSA-PBS pH 7.2 (razblaženje 1:11). Ćelije su potom dva puta ispirane u istom puferu, centrifugirane 10 minuta na 1000 rpm i

resuspendovane u istom puferu za analizu na protočnom citofluorimetru. Kao negativna kontrola korišćene su nebojene ćelije inkubirane u puferu bez antitela. Dobijeni podaci su analizirani u Partec FloMax programu.

### 3.4.5. Imunoblot

Tretman ćelijskih linija melanoma IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn prekidan je u različitim vremenskim intervalima ispiranjem ćelija u ledeno hladnom PBS i dodavanjem hladnog rastvora za liziranje. Lizati su kuvani 5 minuta na 100 °C i centrifugirani 20 minuta na 14000 rpm i 4 °C. Supernatanti su prenošeni u nove male konusne epruvete i čuvani na -20 °C. Koncentracija proteina određivana je metodom po Loriju<sup>208</sup>. Po 20 µL uzoraka razblaženih 10 puta u dH<sub>2</sub>O mešano je sa 300 µL rastvora 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0.1 M NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O i 2% K-Na-tartarat u dH<sub>2</sub>O, mešanih u razmeri 98:1:1. Nakon 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano 60 µL Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u dH<sub>2</sub>O. Narednih 30 minuta, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi do razvijanja plave boje. Intenzitet boje određivan je merenjem apsorbancije na 670 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB, Beč, Austrija). Koncentracija proteina određivana je na osnovu standardne krive rastvora BSA u dH<sub>2</sub>O (0.1-1 mg/mL). Uzorci koji sadrže 30 µg proteina mešani su u odnosu 3:1 sa standardnim puferom za nalivanje na gel za elektroforezu<sup>209</sup> i razdvajani elektroforezom na SDS-poliakrilamidnom gelu (8% ili 12%), nakon čega je usledio transfer proteina na Immobilon-P PVDF membranu (EMD Millipore, Bilerika, MA, SAD) u polusuvom Fastblot B43 sistemu za transfer (Biometra, Getingen, Nemačka), primenom 5 mA/cm<sup>2</sup> gela. Nespecifično vezivanje antitela blokirano je 1 h na sobnoj temperaturi 5% BSA ili 5% mlekom u prahu u PBSTw, nakon čega su membrane inkubirane u toku noći na 4 °C sa antitelima specifičnim za p-Akt(Ser473), Akt, p-p70S6K(Thr421/Ser424), p-p70S6K(Thr389), p70S6K, p-ERK1/2(Thr202/Tyr204), ERK1/2, p-p38(Thr180/Tyr182), p38, p-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185), SAPK/JNK ili β-aktin rastvorenim u 1% BSA - PBSTw (razblaženje 1:500); β-katenin, *Notch* 1 ili Okt-3/4 rastvorenim u 3% mleko - PBSTw (razblaženje 1:250). Membrane su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom konjugovanim peroksidazom rena, specifičnim za IgG kunića. Vezana antitela su detektovana ECL reagensom za western blot detekciju. Proteinske trake kvantifikovane su denzitometrijski u programu Scion

Image (Scion Corporation, Frederik, MD, SAD) i preračunate su u odnosu na količinu ukupnih proteina ili  $\beta$ -aktina, a rezultati su prikazani grafički.

#### **3.4.6. Detekcija markera diferencijacije**

Aktivnost tirozinaze određivana je spektrofotometrijskim testom koji meri formiranje obojenog produkta (dopahrom) iz L-dopa supstrata<sup>5</sup>. Tretman B16 ćelija IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn, prekidan je u različitim vremenskim tačkama ispiranjem kultura u PBS. Nakon što je u svim uzorcima izjednačen broj ćelija ( $1 \times 10^6$ ), lizirane su u 100  $\mu$ L PBS pH 6.8 sa 1% Triton X-100 i centrifugirane na 10 000 rpm 5 minuta. Iz svakog uzorka, 40  $\mu$ L lizata mešano je sa 100  $\mu$ L rastvora L-dopa supstrata u fosfatnom puferu (2 mg/mL). Uzorci su inkubirani 15 minuta na 37 °C, a intenzitet braon boje određivan je merenjem apsorbancije na 450 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Za određivanje količine melanina<sup>210</sup>, B16 ćelije su inkubirane sa IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn u različitim vremenskim intervalima, nakon čega su ispirane u PBS i sakupljane tripsinizacijom. Suspenzije ćelija ( $1 \times 10^6$ ) su ispirane dva puta i lizirane u 100  $\mu$ L 1M NaOH. Uzorci su mešani sa 400  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O i inkubirani 1h na 60 °C. Apsorbancija svetlosti merena je na 492 nm u automatskom čitaču za mikrotitarske ploče.

#### **3.4.7. Svetlosna mikroskopija**

Tretman B16 ćelija melanoma IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH, SBA-15pSn ili SBA-15p prekidan je u različitim vremenskim tačkama odlivanjem supernatanta i fiksiranjem ćelija za podlogu 4% paraformaldehidom, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije su dva puta ispirane u PBS i bojene Majerovim hematoksilinom 30 sekundi. Pre analize na svetlosnom mikroskopu, ćelije su ispirane destilovanom, a potom tekućom vodom do razvijanja plave boje. Preparati su montirani glicergelom, nakon čega su posmatrani na Zeiss Axiovert mikroskopu (Zeiss, Jena, Nemačka) i fotografisani pri uveličanju objektiva od 100 $\times$ .

Za analizu morfologije A375 ćelija, kulture različitih gustina tretirane su IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH, SBA-15pSn ili cisplatine. Nakon 72 h, ćelije su ispirane u PBS i fiksirane 4% paraformaldehidom, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije su

dva puta ispirane i bojene hematoksilinom i eozinom (H&E). Preparati su na kraju dehidratirani ispiranjem kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 95%, i 100%), i tretirani ksilolom za ekstrakciju alkohola. Preparati su montirani u glicergel, a ćelije su posmatrane na Leica svetlosnom mikroskopu (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) i fotografisane pri uveličanju objektiva od 40×.

#### **3.4.8. Transmisiona elektronska mikroskopija**

Tretman B16 ćelija  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p, prekidan je u različitim vremenskim tačkama ispiranjem kultura u PBS. Suspenzije ćelija su dva puta ispirane u PBS, centrifugirane 3 minuta na 2000 rpm i fiksirane u 2.5% rastvoru glutaraldehida u 0.1 M fosfatnom puferu pH 7.2, tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Ćelije su potom dva puta ispirane u fosfatnom puferu i postfiksirane u 1% rastvoru osmijum tetraoksida ( $\text{OsO}_4$ ) u istom puferu. Uzorci su dehidratirani serijom etanola rastuće koncentracije i kalupljeni u epoksidnoj Araldit smoli (Fluka, Selze, Nemačka) na 50 °C, tokom 72 časa. Za ultrastrukturnu analizu na nivou TEM, aralditski kalupi su istrimovani i isečeni dijamantskim nožem (Diatome, Nidau, Švajcarska) na tanke preseke debljine 70 nm na UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka). Preseci su montirani na bakarne mrežice i posmatrani na CM12 TEM (Philips/FEI, Amsterdam, Holandija), a mikrografije su snimane MegaView III digitalnom kamerom (Olympus, Tokio, Japan).

#### **3.4.9. Preuzimanje nanočestica**

Endocitoza je osnovni proces koji ćelije koriste za internalizaciju različitih molekula<sup>211</sup>. Uloga endocitoze u mehanizmu preuzimanja SBA-15pSn nanočestica, ispitivana je u eksperimentima sa inhibitorima energetski-zavisnih procesa<sup>212</sup>. A375 ćelije melanoma su inkubirane sa SBA-15pSn (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) u različitim uslovima: (1) na 37 °C (kontrola), (2) na 4 °C, i (3) nakon pretretmana  $\text{NaN}_3$  (10mM) 30 minuta na 37 °C. Natrijum azid je inhibitor ATPaza; inkubacija ćelija na 4 °C takođe inhibira endocitozu. A375 ćelije su potom inkubirane sa SBA-15pSn u uslovima koji inhibiraju klatrin-zavisne puteve ili kaveolarni put endocitoze. U ovim eksperimentima, ćelije su inkubirane 30 minuta na 37 °C u medijumu za gajenje koji je suplementiran saharozom (0.45M), hipertonični tretman koji onemogućava formiranje klatrinskih vezikula<sup>213</sup>, ili nistatinom (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), agensom koji vezuje holesterol, važnu komponentu kaveola neophodnu za održavanje

strukturnog integriteta ovog vezikularnog kompleksa<sup>214</sup>. Potom je usledila inkubacija sa SBA-15pSn (20 µg/mL), nakon čega su u različitim vremenskim tačkama, suspenzije ćelija ispirane u PBS i pripremane za analizu na nivou TEM.

#### **3.4.10. Indukcija melanoma i tretman životinja**

B16 ćelije ( $2.5 \times 10^5$ ) su ubrizgavane subkutano u desni dorzalni lumbosakralni region singenih C57BL/6 miševa. Terapija je započeta 10 dana nakon indukcije kada su tumori postali palpabilni. Životinje su nasumično raspoređivane u grupe od 5 jedinki. Analiza urađena nakon raspodele životinja pokazala je da nije bilo statistički značajnih razlika u veličini tumora na početku tretmana između različitih grupa. Kontrolnoj grupi životinja intraperitonealno je ubrizgavan rastvarač ispitivanih agenasa (1% DMSO-PBS). Ostalim grupama je 3 nedeljno intraperitonealno davan rastvor  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u 1% DMSO-PBS, SBA-15pSn ili SBA-15p u PBS (9 mg/kg). Kao pozitivna kontrola, jednoj grupi je 3 puta nedeljno davan lek cisplatina rastvaran u PBS (6 mg/kg). Rast tumora je praćen svakodnevno. Životinje su žrtvovane 28. dana, a rast tumora je kvantifikovan merenjem veličine pojedinačnih tumora svakog miša u tri dimenzije. Antitumorska aktivnost je izražavana kroz merenje volumena tumora ( $\text{mm}^3$ ) računatog po formuli:  $[a \times b^2 \times 0.52]$ , gde je  $a$  najduži, a  $b$  najkraći izmereni dijametar.

#### **3.4.11. Određivanje parametara toksičnosti u urinu semikvantitativnom metodom**

Biohemijski i hematološki parametri urina (proteini, eritrociti/hemoglobin, leukociti, glukoza, nitriti, ketoni, pH, specifična gustina, bilirubin i urobilinogen), određivani su u uzorcima prikupljenim 27. dana od indukcije tumora semikvantitativnim Multistix 10 SG test trakama za analizu urina (Bayer Diagnostics, Nemačka). Na trake je nakapavan urin i poređenjem sa standardnim vrednostima, procenjivani su navedeni parametri.



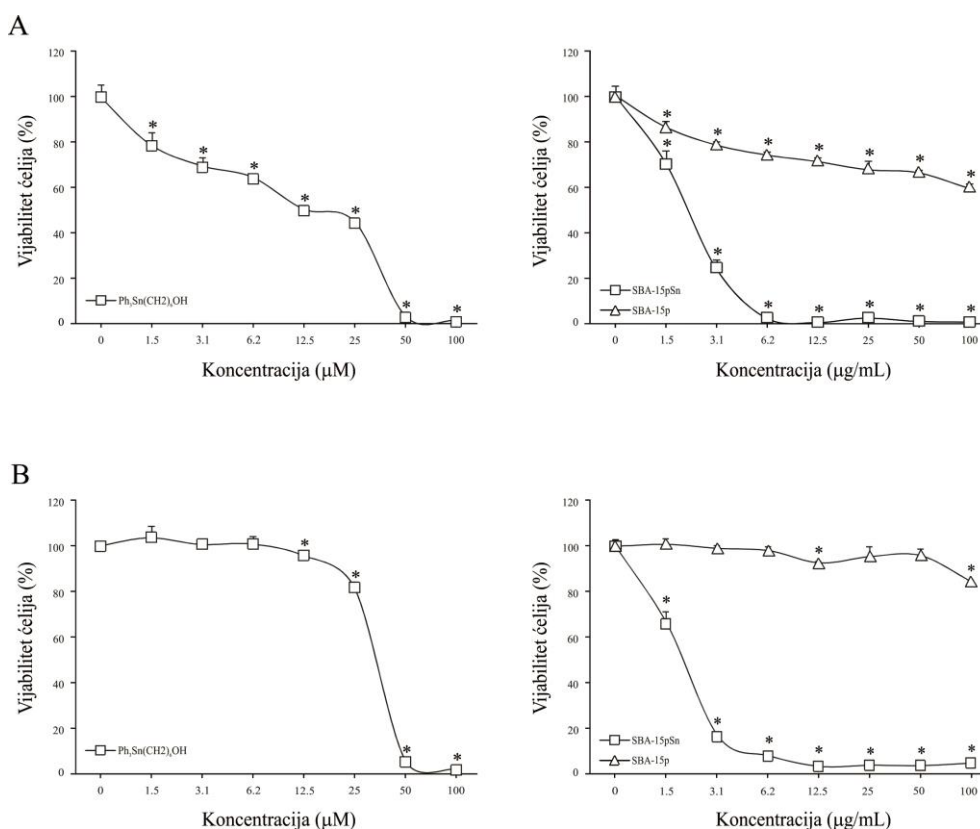
### 3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati *in vitro* eksperimenata su prikazivani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) tri nezavisno izvedena eksperimenta. Za analizu statističke značajnosti korišćen je Studentov *t* test . U *in vivo* eksperimentu, statistička značajnost je definisana Mann-Whitney *U* testom. Vrednost  $p < 0.05$  smatrana je statistički značajnom. Rezultati su analizirani u softverskom programu Statistica (StatSoft, Oklahoma, SAD).

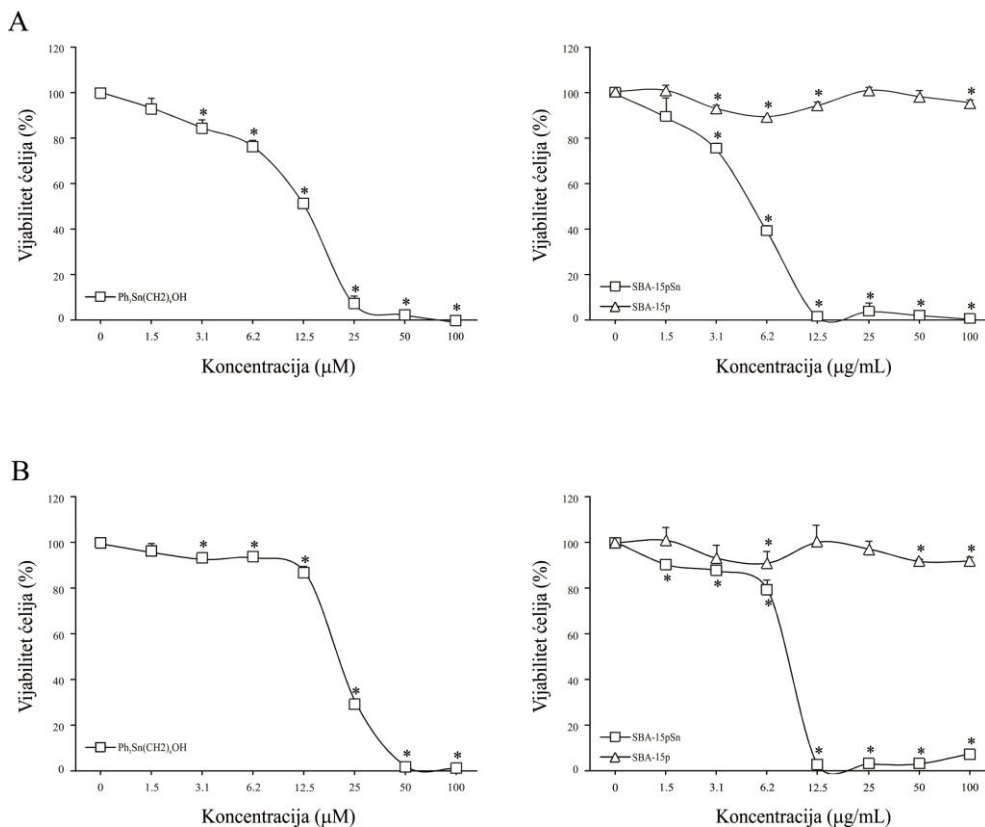
## 4. REZULTATI

#### 4.1. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ inhibira rast ćelija melanoma *in vitro*; adsorpcija na SBA-15 višestruko povećava citotoksični efekat jedinjenja

Za ispitivanje *in vitro* aktivnosti, B16 i A375 ćelije melanoma gajene su u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p tokom 72 h. Vijabilitet ćelija određivan je MTT i kristal violet testom.  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn izazvali su dozno-zavisno smanjenje vijabiliteta ćelija, dok SBA-15p nije imao efekat na rast kultura (Slike 8,9).



Slika 8 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn inhibiraju rast B16 ćelija *in vitro*. Procenat vijabilnih B16 ćelija 72 h nakon tretmana  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p određen A | MTT i B | kristal violet testom. Prikazane su srednje vrednosti + SD tri nezavisno izvedena eksperimenta; \* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolnim uzorcima.



Slika 9 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn inhibiraju rast A375 ćelija *in vitro*. Procenat vijabilnih A375 ćelija 72 h nakon tretmana  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p određen A | MTT i B | kristal violet testom. Prikazane su srednje vrednosti + SD tri nezavisno izvedena eksperimenta; \* $p < 0.05$  u poređenju sa kontrolnim uzorcima.

IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> vrednosti jedinjenja su prikazane u Tabeli 2. Vrednosti za Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH izračunate iz MTT testa su dvostruko niže od vrednosti dobijenih iz kristal violet testa. Ova razlika je posledica smanjenja ćelijske respiracije u odgovoru na toksični stimulus, što se ne ogleda u realnom smanjenju vijabiliteta u nižim dozama jedinjenja. Nasuprot tome, efekat SBA-15pSn na respiraciju, jasan je odraz smanjenog broja vijabilnih ćelija. Koncentracija Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH u MC<sub>50</sub> dozi SBA-15pSn (3.85% Sn) je približno 60× manja od IC<sub>50</sub> doze jedinjenja u slobodnoj formi za B16 ćelije, odnosno 7× za A375 ćelije. U ovoj koncentraciji Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ne utiče na vijabilitet tumorskih ćelija.

**Tabela 2** | IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> vrednosti jedinjenja izračunate iz MTT i kristal violet testa

IC <sub>50</sub> /MC <sub>50</sub>	B16		A375	
	MTT	CV	MTT	CV
Ph <sub>3</sub> Sn(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> OH (μM)	20,2±11,0	38,0±3,5	11,8±1,3	19,3±1,7
SBA-15pSn (μg/mL)	2,1±0,1	2,5±0,6	6,3±1,4	9,3±0,8
SBA-15p (μg/mL)	–	–	–	–

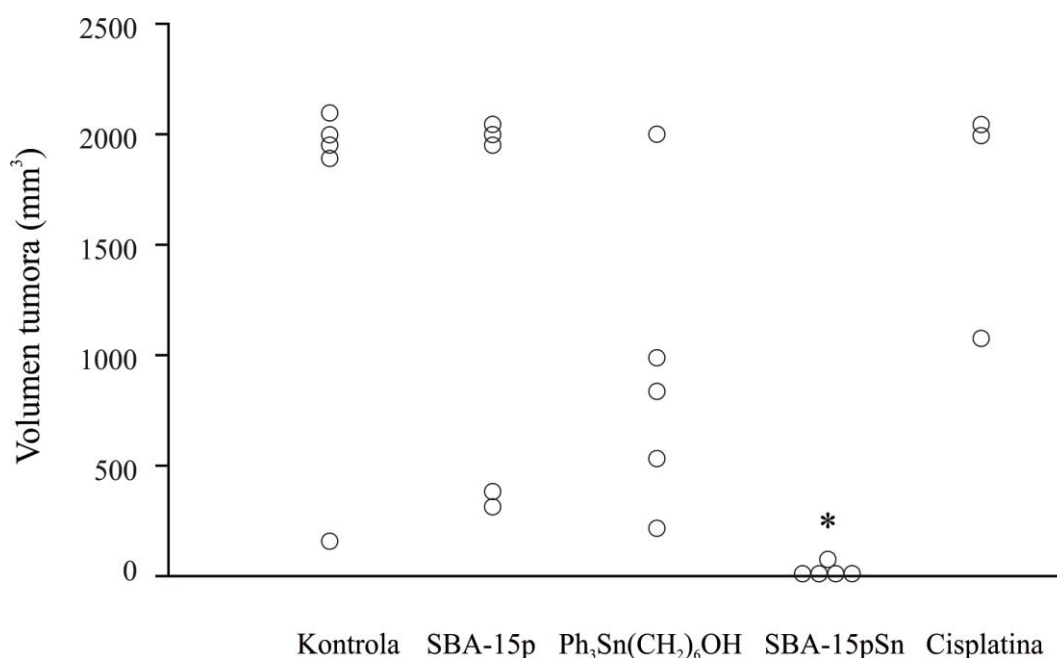
IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> vrednosti predstavljaju srednju vrednost ± SD tri nezavisno izvedena eksperimenta

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je adsorpcija Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH na SBA-15 mezoporozni materijal višestruko povećala citotoksičnost organokalajnog(IV) jedinjenja. Efikasnost SBA-15pSn premašuje aktivnost brojnih jedinjenja koja u svom aktivnom centru sadraže metale, poput Pt<sup>195</sup> ili Ti<sup>181,215–217</sup>, bilo da poseduju specifične ligande ili su uskladišteni u SBA-15 mezoporoznu siliku.

#### **4.2. SBA-15pSn snažnije inhibira rast B16 ćelija melanoma *in vivo* u poređenju sa jedinjenjem u slobodnoj formi**

U prethodnom eksperimentu je utvrđeno da testirana jedinjenja smanjuju vijabilitet B16 ćelija *in vitro*. Kako bi se ustanovilo da li je efikasnost eksperimentalnih terapeutika postojana i u sistemu *in vivo*, B16 ćelije su inokulisane u singeni soj C57BL/6 miševa, a tretman je otpočeo kada su tumori postali palpabilni. Dizajn *in vivo* eksperimenta omogućio je ispitivanje terapijskog efekta testiranih jedinjenja. Kada su u kontrolnoj grupi razvile maksimalno dozvoljeni volumen tumora, životinje su žrtvovane. Rast tumora u grupi životinja koje su tretirane SBA-15 bio je sličan kontrolnoj grupi. Kod miševa koji su tretirani Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn izmereni volumen tumora bio je

manji, ali je statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu ustanovljena samo u grupi životinja koje su tretirane SBA-15pSn. U grupi koja je tretirana konvencionalnim hemoterapeutikom cisplatinom, životinje su razvile tumor maksimalnog volumena ili su umrle usled intoksikacije (Slika 10).



Slika 10 | **Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn inhibiraju rast B16 ćelija *in vivo*.** Volumeni tumora mereni 28. dana od inokulacije B16 ćelija u singeni soj C57BL/6 miševa. Intraperitonealna administracija Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH, SBA-15pSn, SBA-15 ili ciplatine započeta je 10 dana nakon indukcije, kada su tumori postali palpabilni (5 životinja po grupi, \*p< 0.05 u poređenju sa kontrolnom grupom životinja).

Da bi se utvrdilo da li testirana jedinjenja poseduju toksična svojstva, a imajući u vidu postojeće podatke u literaturi o hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti cisplatine, urađena je semikvantitativna analiza biohemijskih i hematoloških parametara u urinu životinja (Tabela 3). Analiza urađena 27. dana od indukcije tumora je potvrdila toksični efekat cisplatine. Kod životinja tretiranih Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn vrednosti ispitivanih parametara nisu odstupale od referentnih, dok je kod miševa kojima je davana cisplatina detektovan visok nivo proteina, zatim prisustvo eritrocita, leukocita i bilirubina u urinu. U celini, rezultati pokazuju da Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH u slobodnoj formi ili nanešen na SBA-15 nije toksičan za eksperimentalne životinje.

**Tabela 3** | Biohemijski i hematološki parametri urina C57BL/6 miševa nakon tretmana SBA-15p,  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili cisplatinom

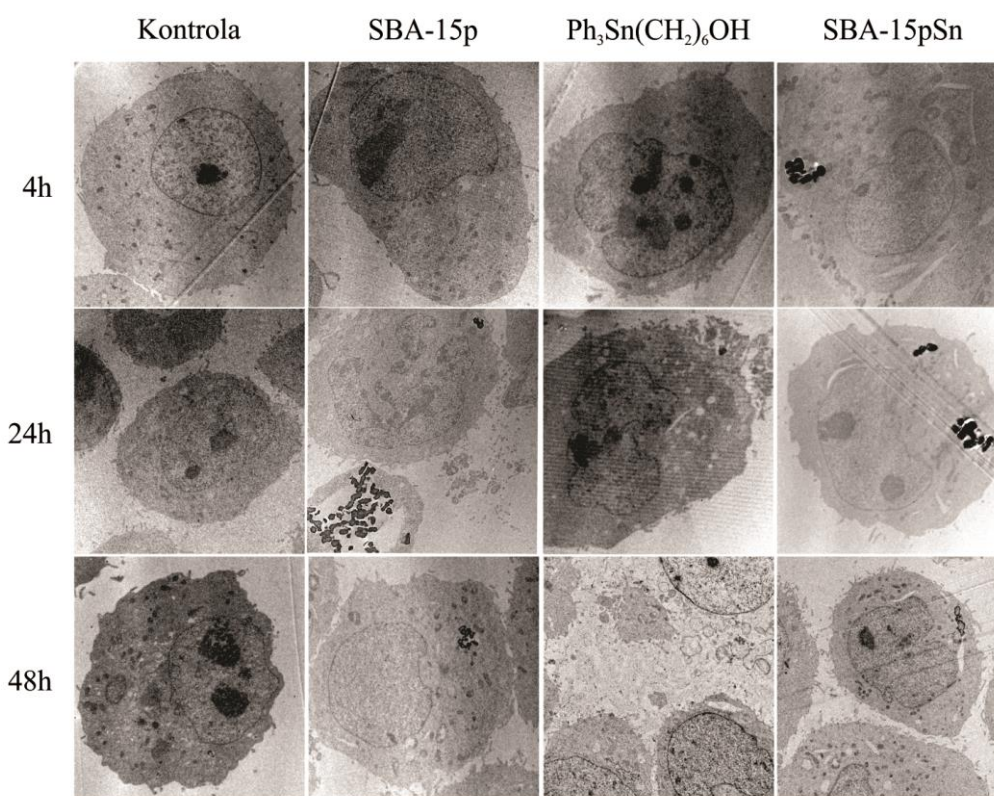
	Kontrola	SBA-15p	$\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	SBA-15pSn	Cisplatin
Proteini (g/L)	0,3	0,3	–	0,3	1
Eritrociti (eri/ $\mu\text{L}$ )	–	–	–	–	80*
Leukociti (leu/ $\mu\text{L}$ )	–	–	–	–	125
Nitriti	–	–	–	–	–
Glukoza (mmol/L)	–	–	–	–	–
Ketoni (mmol/L)	–	–	–	–	–
pH	6,0	6,0	6,5	6,0	6,0
Specifična gustina	1,030	1,030	1,030	1,025	1,015
Bilirubin	–	–	–	–	+
Urobilinogen ( $\mu\text{mol/L}$ )	–	–	–	–	–

\*Eritrociti su hemolizirani

U skladu sa *in vitro* rezultatima, u eksperimentu *in vivo* je potvrđeno da je adsorpcija  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  na SBA-15 mezoporozni materijal povećala terapijsku efikasnost organokalajnog(IV) jedinjenja. Rezultati prvog dela studije nedvosmisleno ukazuju da osmišljeni dizajn eksperimentalnog leka značajno povećava antitumorsko delovanje metalnog agensa bez promene opštih parametara toksičnosti.

#### **4.3. Preuzimanje SBA-15pSn od strane ćelija melanoma odvija se pasivnim putem ili zahteva aktivaciju citoskeleta i formiranje filopodija**

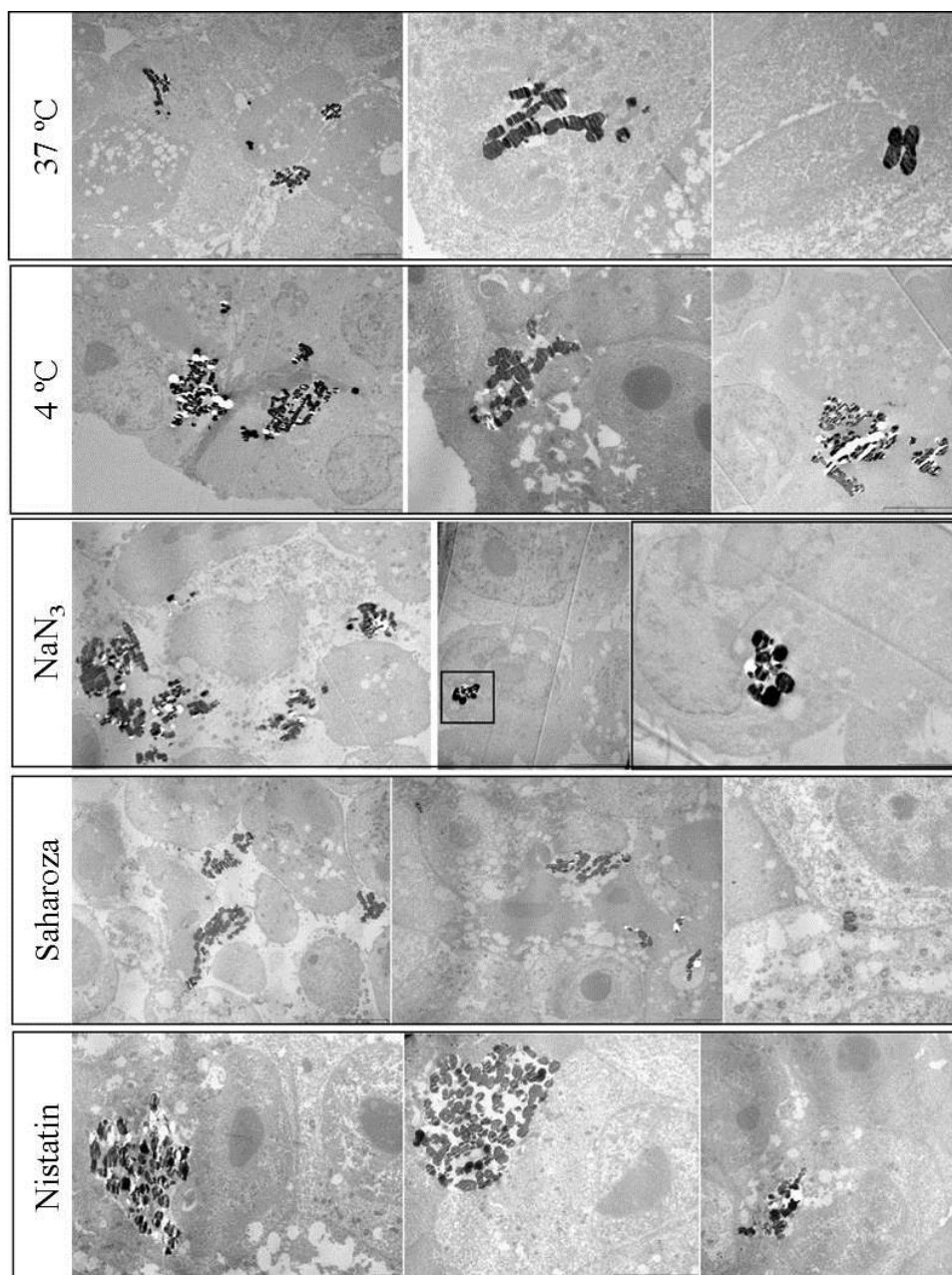
Nakon što je pokazano da skladištenje  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u mezoporozni materijal SBA-15, osnažuje antitumorski potencijal organokalajnog(IV) jedinjenja, sledeći korak bio je da se utvrdi da li ćelije melanoma preuzimaju SBA-15pSn ili deluje sa nivoa membrane. B16 ćelije su gajene u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p u različitim vremenskim intervalima i analizirane na nivou elektronske mikroskopije. Već nakon 4 h inkubacije, u citoplazmi ćelija uočene su čestice SBA-15pSn. Mikroskopska analiza je pokazala normalnu morfologiju B16 ćelija; prisustvo SBA-15pSn nije prouzrokovalo vidljivo oštećenje organela (Slika 11). Iako su čestice SBA-15pSn relativno krupne i nalaze se u blizini mitohondrija, nije zabeležen negativan efekat na ćelijsku respiraciju. Mitohondrijska aktivnost je ostala na istom nivou, što je određeno MTT testom.



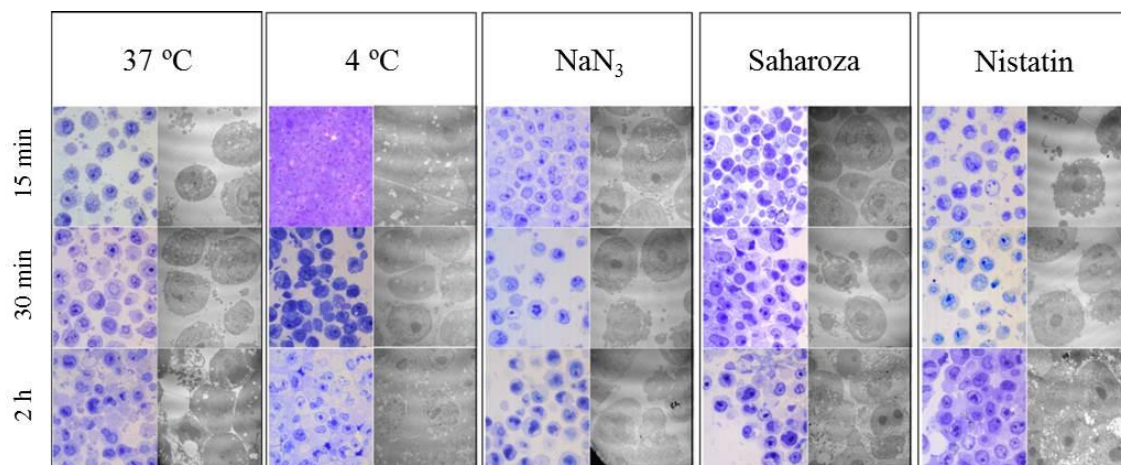
Slika 11 | **SBA-15pSn** ispoljava antitumorsko delovanje unutar B16 ćelija. Reprezentativne TEM mikrografije B16 ćelija melanoma nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom SBA-15p, Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn u naznačenim vremenskim intervalima. Uvećanje: ×4400, orig.

Kada je pokazano da SBA-15pSn ostvaruje antitumorsko delovanje unutar B16 ćelija, sledeći cilj bio je utvrđivanje mehanizma preuzimanja i unutarćelijske distribucije SBA-15pSn u humanim A375 ćelijama melanoma. Za ultrastrukturnu rezoluciju preuzimanja čestica, A375 ćelije su analizirane elektronskom mikroskopijom nakon tretmana SBA-15pSn i inhibitorima endocitotskih puteva u različitim vremenskim intervalima. Na osnovu prikaza TEM mikrografija, preuzimanje SBA-15pSn u A375 ćelije odvijalo se kako u prisustvu inhibitora energetske-zavisnih procesa, tako i u prisustvu inhibitora kaveolarnog i klatrinom-posredovanog puta endocitoze (Slika 12). Zatim, primećena je izmenjena morfologija A375 ćelija nakon tretmana SBA-15pSn. Promene se uočavaju i na nivou ćelijske membrane i nukleusa (Slika 13).



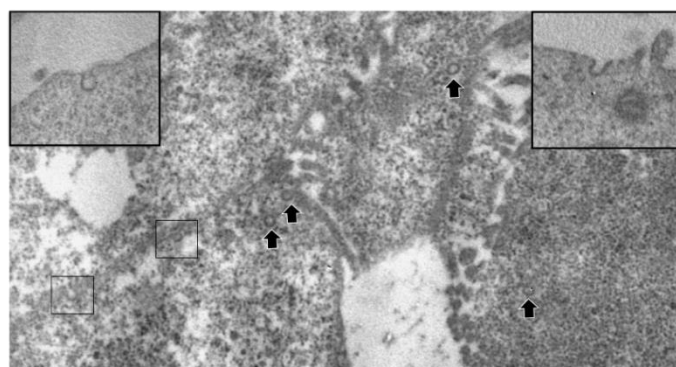


Slika 12 | **Preuzimanje SBA-15pSn u A375 ćelije odvija se i u prisustvu inhibitora energetske zavisnih procesa, kaveolarnog i kltrinom-posredovanog puta.** Reprezentativne TEM mikrografije A375 ćelija nakon tretmana SBA-15pSn (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) u različitim uslovima: na 37 °C (kontrola), na 4 °C, i nakon 30 minuta pretretmana  $\text{NaN}_3$  (10mM), saharozom (0.45M) i nistatinom (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na 37 °C. Uvećanje:  $\times 4400$ , orig; inset na  $\text{NaN}_3$  ( $\square$ )  $\times 5600$ , orig.

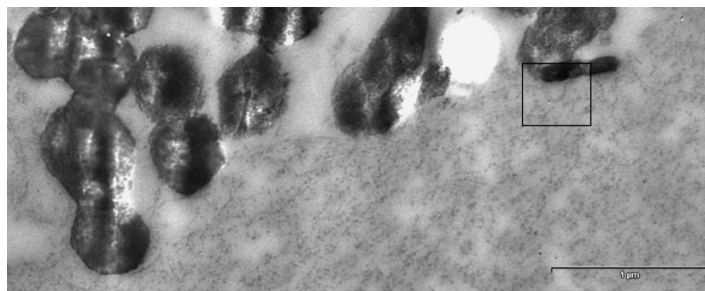


Slika 13 | **Preuzimanje SBA-15pSn menja morfologiju i ultrastrukturu A375 ćelija.** Reprezentativne mikrografije svetlosne i elektronske mikroskopije A375 ćelija nakon tretmana SBA-15pSn (20 µg/mL) u naznačenim vremenskim intervalima i različitim uslovima: na 37 °C (kontrola), na 4 °C, i nakon 30 minuta pretretmana inhibitorima NaN<sub>3</sub> (10mM), saharozom (0.45M) i nistatinom (20 µg/mL) na 37 °C. Uvećanje: svetlosna mikroskopija, semi-fine: ×100, orig; elektronska mikroskopija: ×3000, orig.

Endocitoza u kontrolnoj grupi, ćelijama gajenim na 37 °C, odigravala se podjednako putem kaveola i klatrinom-posredovanim putem (Slika 14). Tretman nistatinom doveo je do smanjenja broja kaveola ali i klatrinskih vezikula, što ukazuje da je u ovom tipu ćelija prisustvo holesterola u ćelijskoj membrani neophodno i za odigravanje klatrinom-posredovane endocitoze (Slika 15).



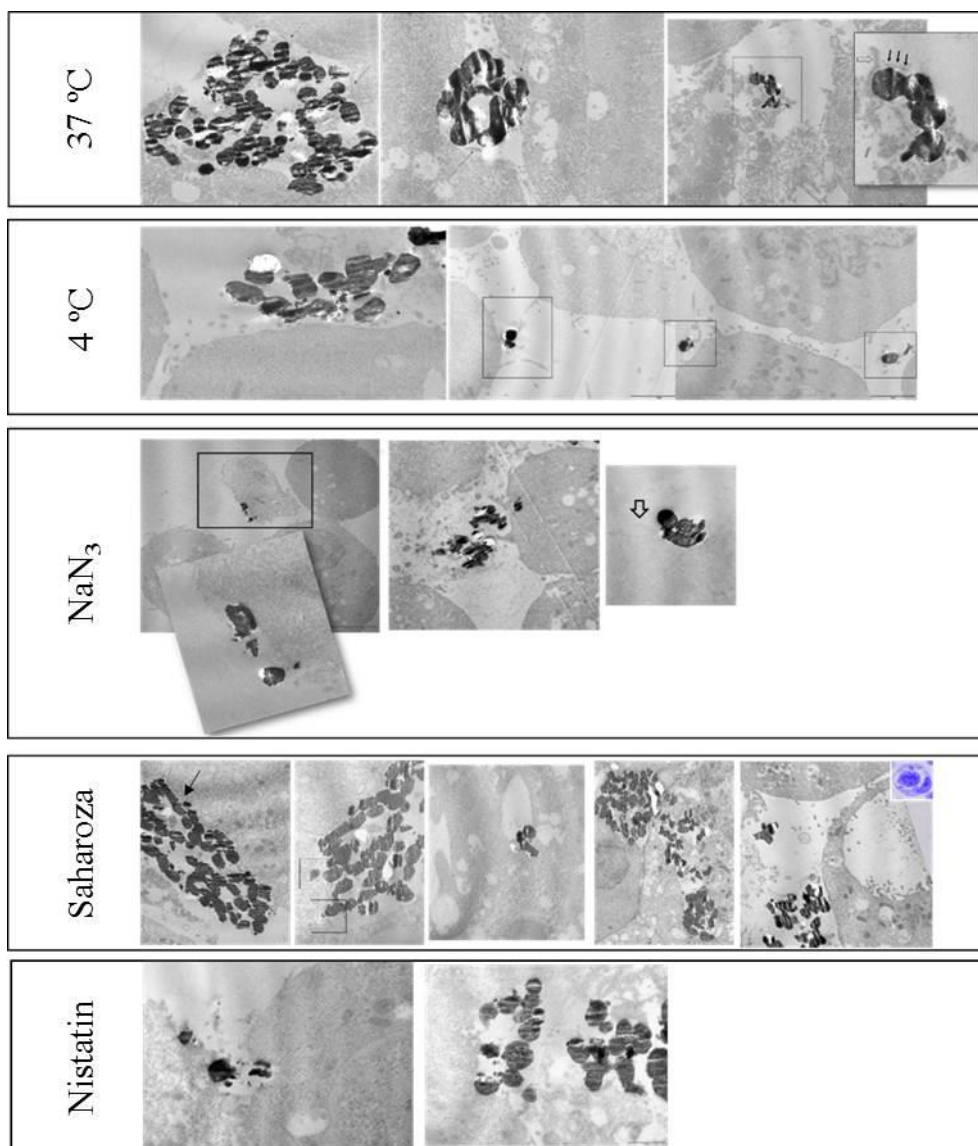
Slika 14 | **Endocitoza u A375 ćelijama odigrava se kaveolarnim i klatrinom-posredovanim putem.** Reprezentativna TEM mikrografija A375 ćelije 2 h nakon tretmana SBA-15pSn (20 µg/mL) na 37 °C i endocitotski uvrati na membrani ćelija (inseti) 30 minuta nakon tretmana SBA-15pSn na 37 °C pri većem uvećanju. Uočava se formiranje kaveolinskih (□ i inset levo) i klatrinskih vezikula (→ i inset desno). Uvećanje: ×13000, orig.



Slika 15 | **Nistatin smanjuje broj kaveola i klatrinskih vezikula u A375 ćelijama.** Reprezentativna TEM mikrografija A375 ćelije nakon kotretmana SBA-15pSn (20  $\mu\text{g/mL}$ ) i nistatinom (20  $\mu\text{g/mL}$ ) tokom 2 h na 37 °C. Retke i pojedinačno prisutne kaveole ( $\square$ ) pokazuju odsustvo dinamina i dezorganizaciju. Uvećanje:  $\times 15000$ , orig.

U prvih 15 minuta, SBA-15pSn adherira na površinu A375 ćelija indukujući savijanje membrane čiji stepen zavisi od veličine SBA-15pSn, dužine tretmana i vrste inhibitora. Iako je zabeleženo da A375 ćelije preuzimaju mezoporozne nanočestice silike pasivnim putem<sup>218</sup>, produžavanjem vremena inkubacije na 2 h zapaženo je unošenje SBA-15pSn putem dva mehanizma, pasivnim fluidno-faznim preuzimanjem i makropinocitozom. Preuzimanje čestica makropinocitozom aktivnim zahvatanjem kako samostalnih SBA-15pSn, tako i apoptotskih tela i detritusa poreklom od ćelija koje su internalizovale SBA-15pSn, podrazumeva prisustvo filopodija. Tretman saharozom naročito favorizuje makropinocitozno i fagocitarno ponašanje ćelija melanoma. Uneti SBA-15pSn *beži* iz endozoma i zapaža se slobodno prisutan u citoplazmi i nukleoplazmi, kao i uz mitohondrije (Slika 16).

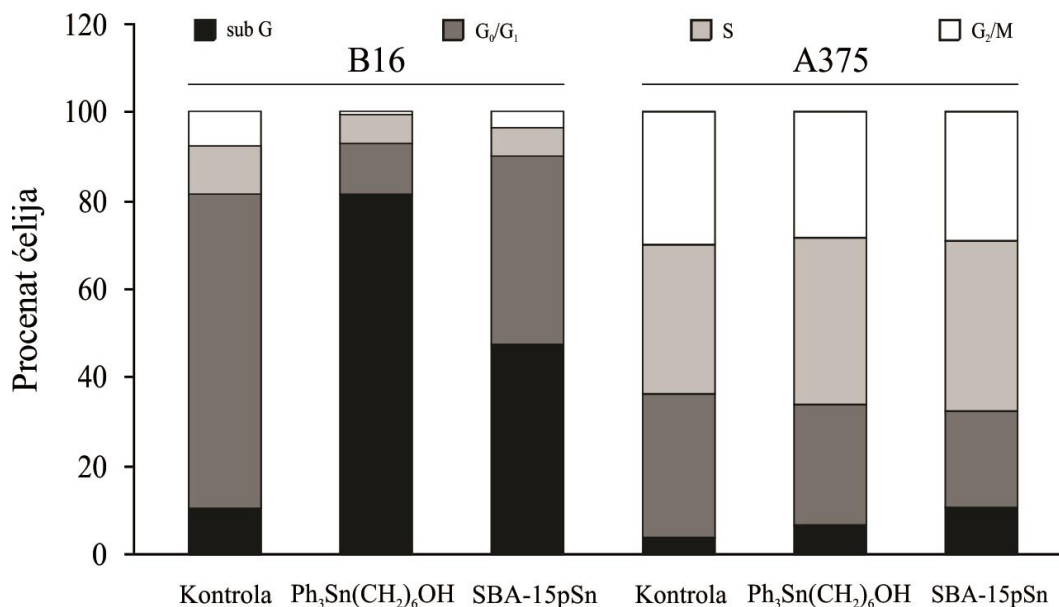
U celini, eksperiment sa inhibitorima pokazao je da preuzimanje SBA-15pSn u A375 ćelije ne zahteva energiju ni dinaminom-posredovane puteve endocitoze. Inhibicija posredno smanjuje količinu unetih mezoporoznih čestica u odnosu na kontrolu, ali je ne sprečava. Ulogu u tome ima veličina, oblik i vrsta površine koja stupa u interakciju sa membranom ćelija i tako doprinosi specifičnosti preuzimanja, a samim tim i delovanja.



Slika 16 | A375 ćelije preuzimaju SBA-15pSn pasivnim putem i makropinocitozom. Reprezentativne TEM mikrografije A375 ćelija nakon tretmana SBA-15pSn (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) u različitim uslovima: na 37 °C (kontrola), na 4 °C, i nakon 30 minuta pretretmana inhibitorima NaN<sub>3</sub> (10mM), saharozom (0.45M) i nistatinom (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na 37 °C. Na nivou svetlosne mikroskopije prikazana je fagocitoza A375 ćelije od strane susedne ćelije. SBA-15pSn ( $\rightarrow$ ) adherira na ćelijsku membranu A375 ćelija ( $\square$ ) i biva zahvaćen filopodijama ( $\Rightarrow$ ). Uvećanje:  $\times 4400$ , orig; inseti:  $\times 5600$ , orig; inset semi-fine:  $\times 100$ , orig.

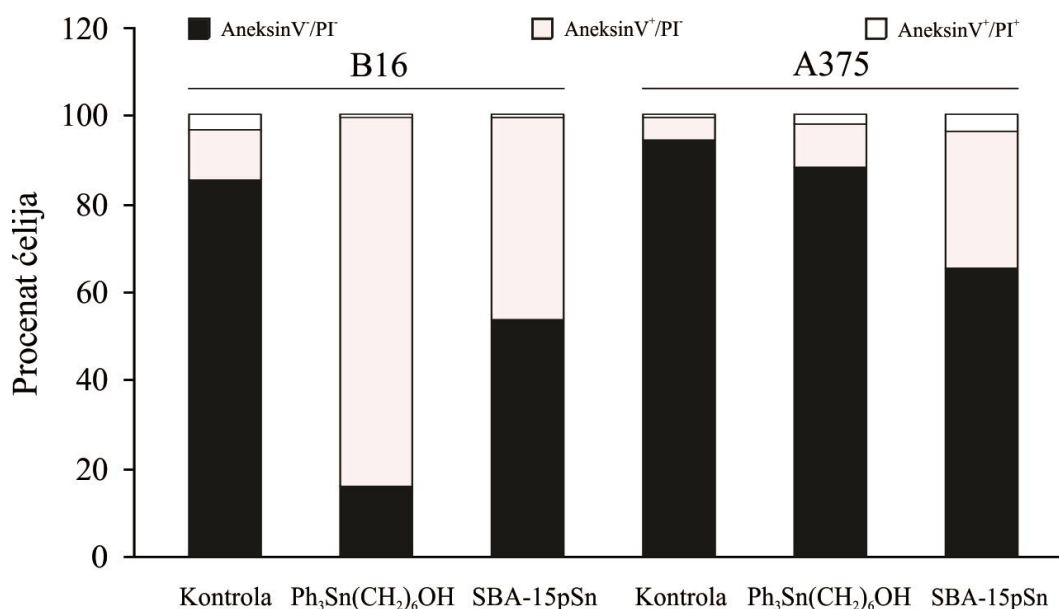
#### 4.4. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] i SBA-15pSn indukuju apoptozu ćelija melanoma zavisnu od aktivacije kaspaza

Prethodni rezultati su pokazali da Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn inhibiraju rast ćelija melanoma *in vitro* i *in vivo*. U sledećem eksperimentu, ispitivan je je fenomen u osnovi smanjenog vijabiliteta ćelija melanoma. Prvi korak u utvrđivanju mehanizma delovanja eksperimentalnog leka je analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, koja može da nagovesti da li je u osnovi citotoksičnosti leka indukcija ćelijske smrti ili zastoje u ćelijskoj deobi. Ćelije melanoma su inkubirane u prisustvu Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn tokom 72 h. Potom su bojene PI i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Na osnovu intenziteta crvene fluorescencije, razvrstavane su po fazama ćelijskog ciklusa. Dobijeni rezultati su pokazali da u B16 ćelijama melanoma, Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn indukuju značajnu fragmentaciju DNK potvrđenu akumulacijom ćelija u subG fazi ćelijskog ciklusa. U A375 ćelijama je takođe zabeležen porast broja hipodiploidnih ćelija u subG fazi, kao i povećanje procentualne zastupljenosti ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa (Slika 17).



Slika 17 | Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn indukuju povećanje procenta ćelija melanoma u subG fazi ćelijskog ciklusa. Distribucija B16 i A375 ćelija bojenih PI po fazama ćelijskog ciklusa 72 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn određena protočnom citofluorimetrijom.

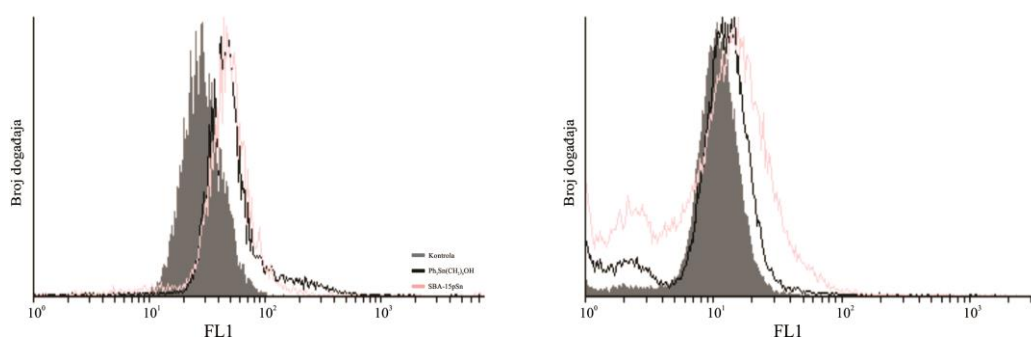
Indukcija apoptoze se nalazi u osnovi antitumorske aktivnosti većine hemoterapeutskih lekova<sup>219</sup>. U skladu sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa koji su ukazali na prisustvo ćelija sa fragmentisanom DNK, karakteristike apoptotskih ćelija, na prvom mestu je ispitivana indukcija ovog tipa programirane ćelijske smrti. B16 i A375 ćelije melanoma su inkubirane sa IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn. Nakon 72 h, uzorci su bojeni aneksin V-FITC i PI. Analiza protočnom citofluorimetrijom je u obe ćelijske linije ukazala na prisustvo ćelija u ranoj apoptozi. U saglasnosti sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa gde je pokazano da je akumulacija B16 ćelija u subG fazi najizraženija nakon tretmana Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH, najveći procenat aneksinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> ćelija zabeležen je u B16 ćelijama koje su inkubirane u prisustvu slobodnog jedinjenja (Slika 18).



Slika 18 | Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn indukuju programiranu ćelijsku smrt apoptozom. Procenat B16 i A375 ćelija melanoma bojenih aneksin V-FITC i PI u apoptozi 72 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom.

Kako bi se utvrdilo da li su kaspaze efektori smrti ćelija melanoma, B16 i A375 ćelije su inkubirane u prisustvu IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> doze Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn tokom 72 h i bojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom Z-VAD-fmk (ApoStat). Analiza rezultata protočnom citofluorimetrijom potvrdila je da testirani agensi indukuju apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza (Slika 19).

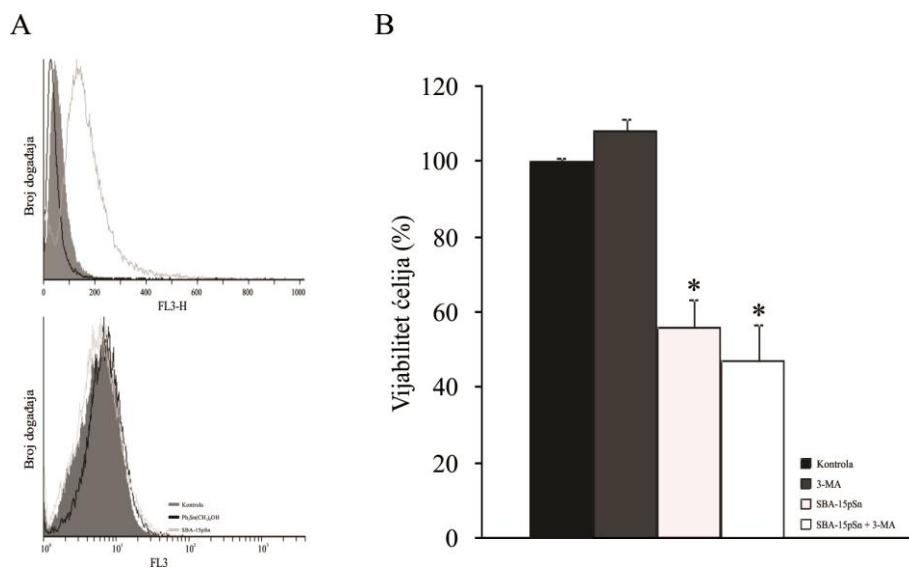




Slika 19 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i  $\text{SBA-15pSn}$  indukuju apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza. Intenzitet fluorescencije A | B16 i B | A375 ćelija obeleženih ApoStat bojom 72 h nakon tretmana  $\text{IC}_{50}/\text{MC}_{50}$  dozom  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili  $\text{SBA-15pSn}$  određen protočnom citofluorimetrijom prikazan je reprezentativnim histogramom.

#### 4.5. $\text{SBA-15pSn}$ indukuje autofagiju u B16 ćelijama melanoma

Nakon što je pokazano da je ćelijska smrt apoptozom delom odgovorna za smanjenje broja vijabilnih ćelija melanoma, bilo je interesantno da se ispita doprinos programirane ćelijske smrti autofagijom antitumorskoj aktivnosti testiranih jedinjenja. B16 i A375 ćelije su gajene u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili  $\text{SBA-15pSn}$  tokom 72 h, bojene akridin oranžom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Povećanje broja autofagozoma je detektovano u B16 ćelijama melanoma nakon tretmana  $\text{SBA-15pSn}$ . U A375 ćelijama nije zabeležena promena u intenzitetu crvene fluorescencije nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima (Slika 20). U ćelijama sa intaktnim apoptotskim mehanizmima primarna uloga autofagije je preživljavanje, umesto indukcije ćelijske smrti<sup>220</sup>. Kako bi se ispitalo da li je autofagija odbrambeni mehanizam, B16 ćelije su inkubirane u prisustvu  $\text{SBA-15pSn}$  i specifičnog inhibitora autofagije 3-MA tokom 72 h. Vijabilitet ćelija melanoma je određivan kristal violet testom. Neutralizacija autofagije jasno je ukazala da je ovaj proces imao citoprotektivan efekat i nije doprineo smanjenju ćelijskog vijabiliteta.

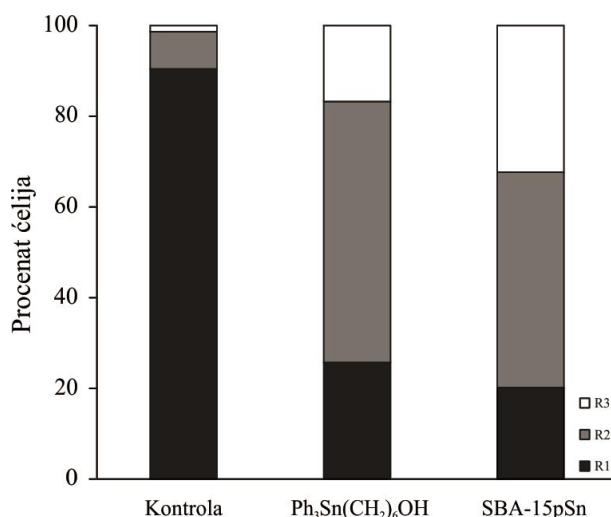


Slika 20 | **SBA-15pSn indukuje autofagiju koja deluje citoprotektivno u B16 ćelijama.** A | Intenzitet fluorescencije B16 i A375 ćelija bojenih akridin oranžom 72 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom prikazan je reprezentativnim histogramom. B | Procenat vijabilnih ćelija 72 h nakon tretmana SBA-15pSn i 3-MA određen kristal violet testom. Prikazane su srednje vrednosti + SD tri nezavisno izvedena eksperimenta; \*p < 0.05 u poređenju sa kontrolnim uzorcima.



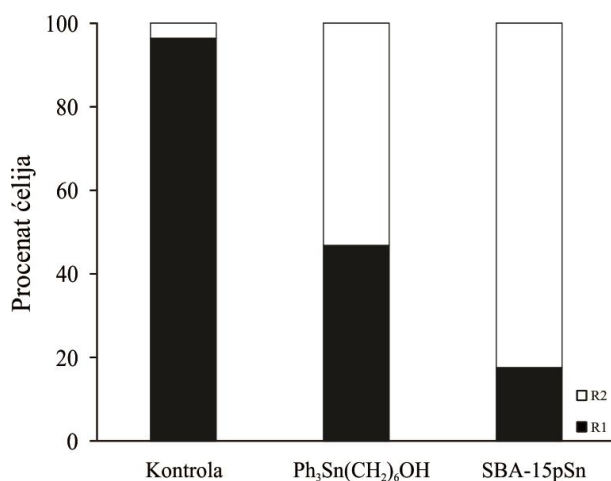
#### 4.6. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn inhibiraju proliferaciju ćelija melanoma

U brojnim studijama je već pokazano da pojedini agensi prirodnog ili sintetskog porekla indukuju apoptozu u određenoj subpopulaciji ćelija neuroekstodermalnih tumora koja je praćena inhibicijom proliferacije preživelih ćelija u kulturi<sup>221–224</sup>. Rezultati prethodnih eksperimenata su pokazali da 72 h nakon tretmana  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn u ćelijama melanoma dominira apoptoza kao glavni mehanizam antitumorskog delovanja. Kako bi se ispitao proliferativni potencijal preživelih ćelija u kulturi, ćelije melanoma su najpre obeležene vitalnom bojom CFSE, a zatim inkubirane u prisustvu testiranih jedinjenja tokom 96 h. Analiza protočnom citofluorimetrijom je pokazala da u B16 ćelijama melanoma  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn indukuju zastoj već u prvoj deobi, kao i prisustvo nepodeljenih ćelija (Slika 21).



Slika 21 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn indukuju inhibiciju proliferacije B16 ćelija. Procenat B16 ćelija u drugoj (R1) i prvoj deobi (R2) i nepodeljenih ćelija (R3) obeleženih CFSE bojom 96 h nakon tretmana  $\text{IC}_{50}/\text{MC}_{50}$  dozom  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom.

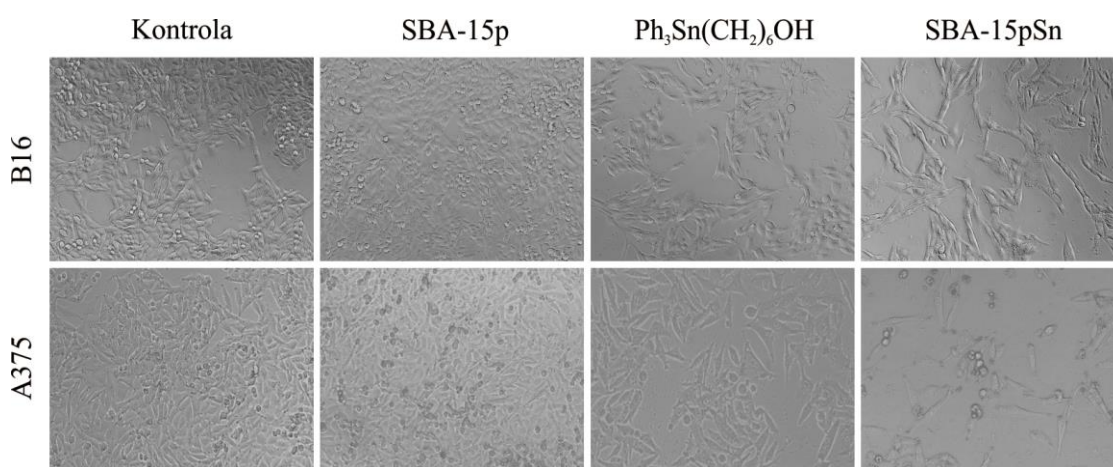
U A375 ćelijama zabeležena je snažna inhibicija u prvoj deobi (Slika 22). Citostatski efekat je bio posebno izražen u ćelijama nakon tretmana SBA-15pSn. U celini, rezultati ukazuju da je primarni mehanizam antitumorskog delovanja  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u A375 ćelijama inhibicija proliferacije umesto indukcija ćelijske smrti, dok u B16 ćelijama oba mehanizma doprinose podjednako.



Slika 22 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn indukuju zastoj u deobi A375 ćelija. Procenat A375 ćelija u prvoj deobi (R1) i nepodeljenih ćelija (R2) obeleženih CFSE bojom 96 h nakon tretmana  $\text{IC}_{50}/\text{MC}_{50}$  dozom  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom.

#### 4.7. SBA-15pSn indukuje morfološku transformaciju ćelija melanoma

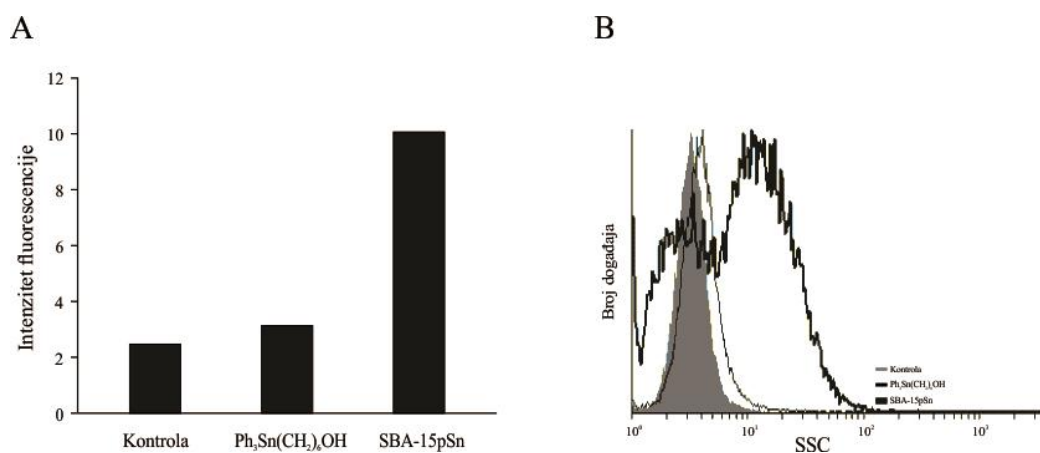
Gubitak deobnog potencijala često je povezan sa morfološkom transformacijom ćelija. Nakon što je utvrđeno da  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn indukuju zastoj u proliferaciji ćelija melanoma, u sledećem koraku analiziran je izgled ćelija u kulturi nakon tretmana testiranim jedinjenjima. B16 i A375 ćelije su inkubirane u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15p i analizirane na nivou svetlosne mikroskopije. U saglasnosti sa rezultatima *in vitro* testova, SBA-15p nije uticao na rast i morfologiju ćelija melanoma. Zatim, u poređenju sa kontrolama uočena je redukcija broja ćelija u kulturama koje su inkubirane u prisustvu testiranih jedinjenja. Mikroskopska analiza je ukazala na jasnu razliku između kontrolnih B16 ćelija ovalnog oblika, i ćelija inkubiranih u prisustvu SBA-15pSn koje karakteriše vretenast izgled sa uvećanom citoplazmom i membranskim nastavcima nalik na dendrite. Uporedo sa B16 ćelijama, uočena je jasna promena u morfologiji A375 ćelija melanoma. Nakon tretmana SBA-15pSn, A375 ćelije imale su izdužen, pljosnat oblik i značajno veći volumen citoplazme u odnosu na kontrolne ćelije heterogenog izgleda (Slika 23).



Slika 23 | **SBA-15pSn menja morfologiju ćelija melanoma *in vitro*.** Reprezentativne mikrografije na nivou svetlosne mikroskopije B16 i A375 ćelija 72 h nakon tretmana  $\text{IC}_{50}/\text{MC}_{50}$  dozom  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili SBA-15. Uvećanje:  $\times 10$ , orig.

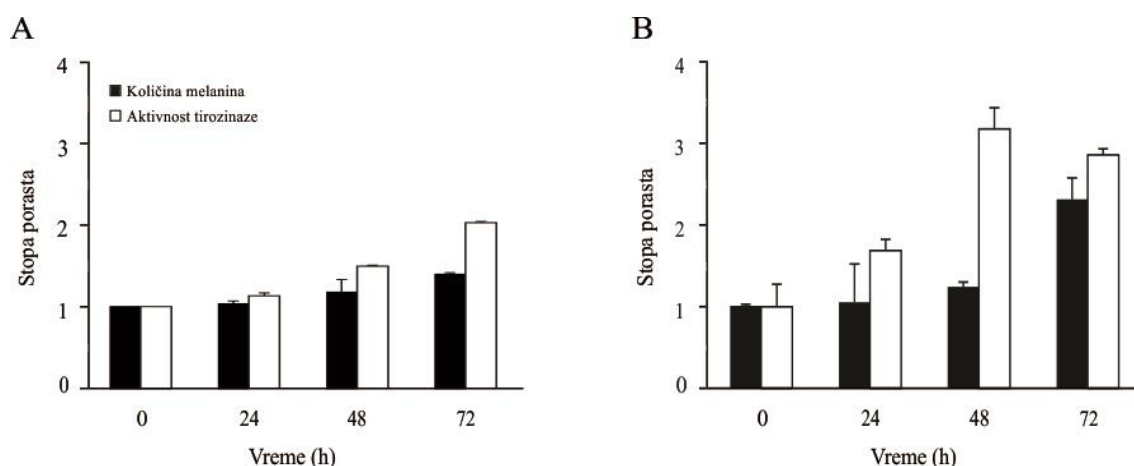
#### 4.8. SBA-15pSn aktivira melanogenezu u B16 ćelijama koju prati ulazak u stanje prevremene senescencije

Ćelijsku senescenciju karakterišu upečatljive morfološke promene; ćelije postaju velike, pljosnate i vretenaste. Prepoznatljive karakteristike senescencije uključuju prisustvo vakuola, pozitivno bojenje na SA- $\beta$ -Gal marker i angažovanje ključnih efektorskih puteva (p53 i Rb)<sup>225</sup>. Zastoj u ćelijskom ciklusu i morfološka transformacija B16 ćelija ukazuju da je u osnovi antitumorskog delovanja SBA-15pSn indukcija prevremene ćelijske senescencije. Kako bi se utvrdilo da li testirana jedinjenja indukuju senescenciju ćelija melanoma, B16 ćelije su inkubirane u prisustvu Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn tokom 96 h, nakon čega su bojene fluorogenim supstratom enzima SA- $\beta$ -Gal, markerom senescentnih ćelija u kulturi, i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Očekivano, tretman SBA-15pSn je doveo do povećanja ekspresije SA- $\beta$ -Gal, čime je potvrđeno da testirani agens indukuje prevremenu senescenciju B16 ćelija. Povećanje granularnosti ćelija nakon tretmana SBA-15pSn, detektovano FACS analizom, ukazuje na citološke promene koje vode ka senescenciji ili diferencijaciji ćelija (Slika 24).



Slika 24 | SBA-15pSn indukuje prevremenu senescenciju B16 ćelija. A | Intenzitet fluorescencije i B | granularnost B16 ćelija obeleženih FDG bojom 96 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn određeni protočnom citofluorimetrijom prikazani su reprezentativnim histogramom.

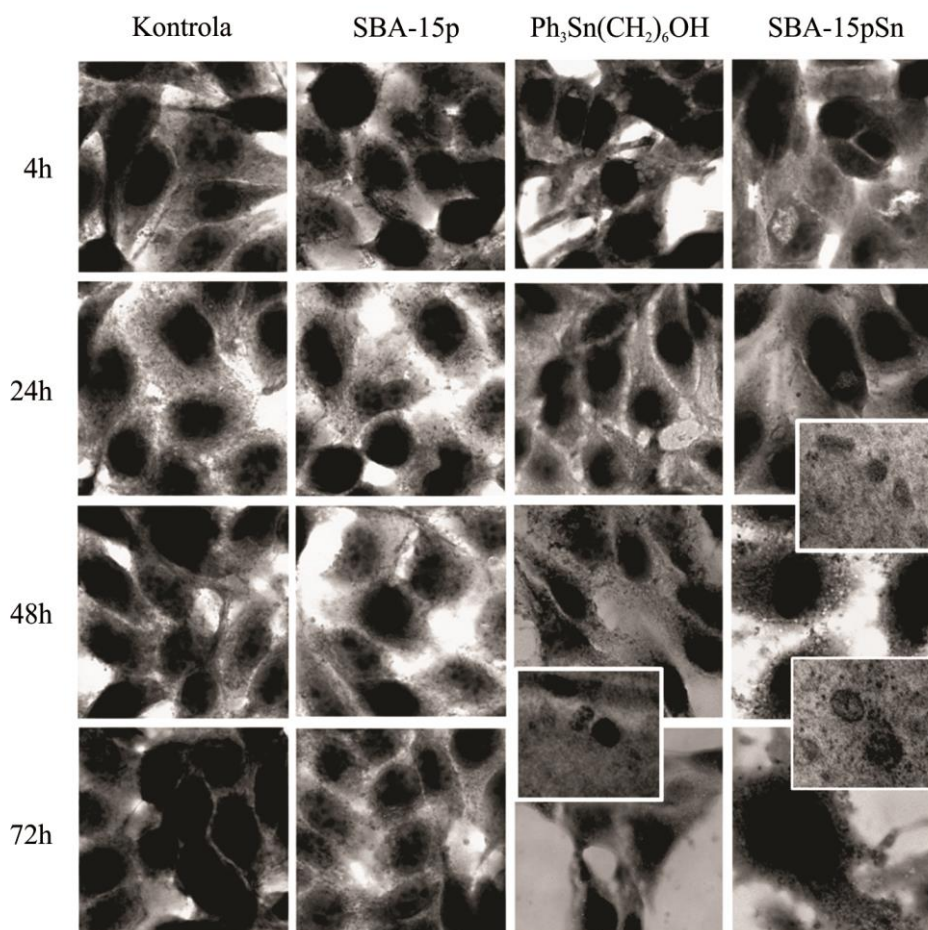
Visok nivo pigmentacije može da ubrza prevremenu senescenciju melanocita putem indukcije p16<sup>INK4a226,227</sup>. U skladu sa tim, bilo je interesantno da se ispita ekspresija markera diferencijacije B16 ćelija nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima. B16 ćelije su inkubirane sa Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn u različitim vremenskim intervalima, nakon čega je spektrofotometrijski određivana aktivnost tirozinaze i sadržaj melanina. Povećanje aktivnosti tirozinaze zabeleženo je u B16 ćelijama inkubiranim u prisustvu SBA-15pSn tokom 48 h, dok je visok nivo melanina izmeren 24 h kasnije. Nasuprot tome, Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH je indukovao neznatan porast markera diferencijacije. Navedeni rezultati pokazuju da SBA-15pSn stimuliše produkciju melanina koja je povezana sa senescencijom ćelija melanoma (Slika 25).



Slika 25 | **SBA-15pSn indukuje povećanje markera diferencijacije B16 ćelija.** Aktivnost tirozinaze i sadržaj melanina u B16 ćelijama 72 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom A | Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili B | SBA-15pSn određeni spektrofotometrijski. Prikazane su srednje vrednosti + SD tri nezavisno izvedena eksperimenta.

Morfološka transformacija i pigmentacija povezana sa senescencijom ćelija melanoma, potvrđena je na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije. B16 ćelije su inkubirane sa Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn u različitim vremenskim intervalima, potom bojene hematoksilinom i analizirane na nivou svetlosne mikroskopije. Dok su u prisustvu Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH u kulturama uočene tipične morfološke promene ćelija u apoptozi, SBA-15pSn je indukovao promene koje su karakteristične za senescenciju/terminalnu diferencijaciju melanocita - povećanje veličine i dendritičnosti ćelija i prisustvo velikog broja melanozoma. Nakon 48 h, kada je izmereno povećanje aktivnosti tirozinaze, u citoplazmi B16 ćelija vidljive su bele vezikule koje predstavljaju premelanozome. Već

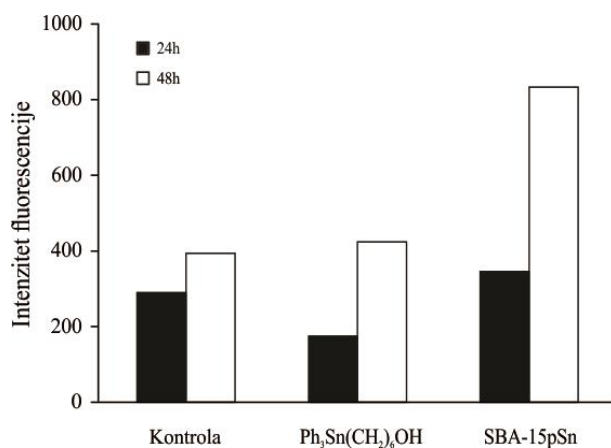
72 h, uočeni su zreli melanozomi, što je u saglasnosti sa izmerenim sadržajem melanina. Na TEM mikrografijama B16 ćelija, uočavaju se brojni nezreli melanozomi 48 h nakon tretmana SBA-15pSn, dok su u ćelijama inkubiranim u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  jasno vidljiva apoptotska tela (Slika 26).



Slika 26 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  indukuje apoptotske promene, dok SBA-15pSn menja izgled B16 ćelija u smeru senescencije/terminalne diferencijacije. Reprezentativne mikrografije svetlosne mikroskopije B16 ćelija bojenih Majerovim hematoksilinom nakon tretmana SBA-15p,  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn u naznačenim vremenskim intervalima; inseti: elektron-mikrografije B16 ćelija prikazuju premelanozome i melanozome u sazrevanju. Uvećanje: svetlosna mikroskopija:  $\times 100$ , orig; elektronska mikroskopija:  $\times 11500$ , orig.

#### 4.9. SBA-15pSn stimuliše produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsti u B16 ćelijama

Ulazak u prevremenu ćelijsku senescenciju mogu da posreduju reaktivne vrste kiseonika i azota (engl. *reactive oxygen and nitrogen species*, ROS/RNS)<sup>228–232</sup>. Uloga slobodnih radikala u indukciji senescencije B16 ćelija, analizirana je bojenjem ćelija melanoma DHR fluoroforom nakon tretmana testiranim jedinjenjima u različitim vremenskim tačkama. Analiza unutarćelijskog nivoa ROS/RNS, ukazala je na intenzivnu produkciju slobodnih radikala u kulturama koje su tretirane SBA-15pSn. Ovaj fenomen mogao bi da bude u direktnoj vezi sa senescencijom ćelija melanoma (Slika 27).



Slika 27 | **SBA-15pSn stimuliše produkciju ROS/RNS u B16 ćelijama.** Intenzitet fluorescencije B16 ćelija bojenih DHR fluoroforom 24 h i 48 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom.

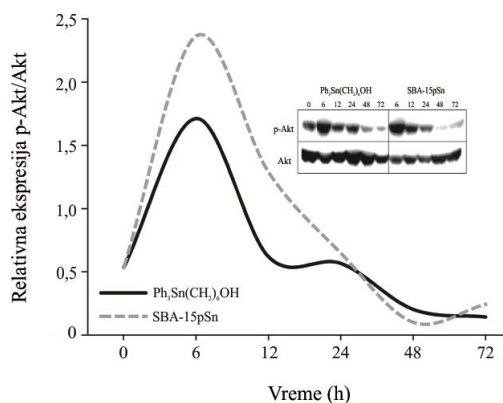
#### **4.10. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] i SBA-15pSn menjaju aktivnost PI3K i MAPK signalnog puta u B16 ćelijama**

Nakon što je pokazano da SBA-15pSn smanjuje vijabilitet B16 ćelija *in vitro* i *in vivo*, indukcijom apoptoze koja je praćena inhibicijom deobe preživelih ćelija, sa razvojem senescentnog fenotipa, analiziran je uticaj jedinjenja na PI3K i MAPK signalne puteve koji mogu da aktiviraju prevremenu senescenciju posredovanu p53 i p16<sup>INK4a</sup> tumor supresorima<sup>233–239</sup>. B16 ćelije su gajene u prisustvu IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> doze Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn u različitim vremenskim intervalima, nakon čega je određivana ekspresija ključnih signalnih molekula imunoblot metodom.

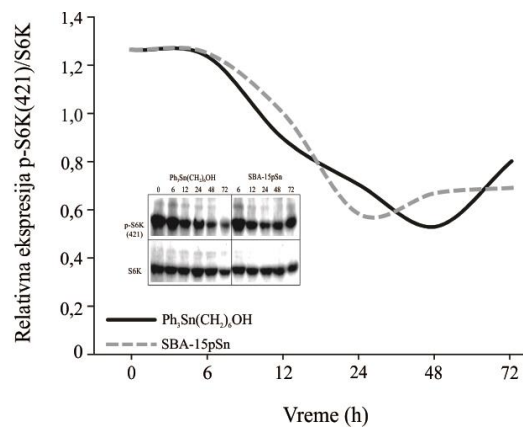
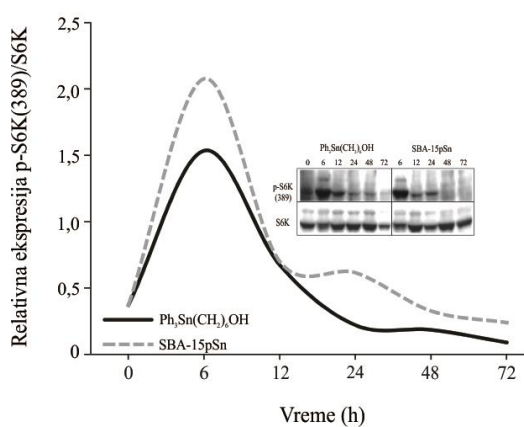
##### **4.10.1. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] i SBA-15pSn indukuju prolaznu aktivaciju Akt i p70S6K koja se završava gašenjem ovog signalnog puta u B16 ćelijama**

Analiza ekspresije signalnih molekula PI3K puta nakon tretmana testiranim agensima, ukazala je na sinhronizovanu regulaciju Akt proteina i p70S6 kinaze u B16 ćelijama. Nakon inicijalnog povećanja fosforilacije Akt proteina na mestu Ser473 (Slika 28) kao i fosforilacije p70S6 kinaze na mestu Thr389 (Slika 29), koja je presudna za aktivaciju enzima, ovaj signalni put se gasi. Negativna regulacija Akt signalnog puta potvrđena je progresivnom inhibicijom fosforilacije Thr421/Ser424 u autoinhibitornom domenu, koja je neophodna za održavanje aktivne konformacije p70S6K (Slika 29). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa ranije pokazanim smanjenjem proliferativnog potencijala u kulturama nakon tretmana Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn.





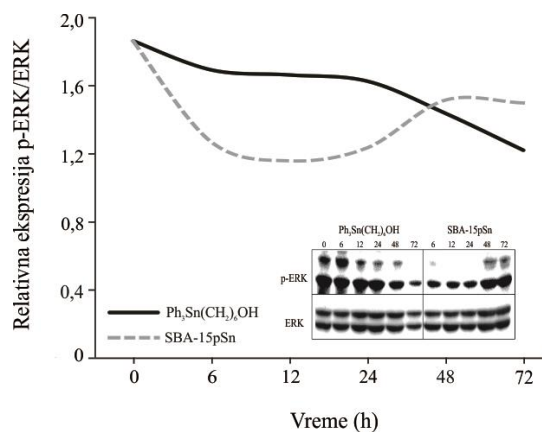
Slika 28 | **Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn negativno regulišu aktivnost Akt u B16 ćelijama.** Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije Akt proteina i reprezentativni imunoblot. Ekspresija fosforilisanog i ukupnog Akt određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.



Slika 29 | **Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn negativno regulišu aktivnost p70S6K u B16 ćelijama.** Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije p70S6K i reprezentativni imunoblot. Ekspresija fosforilisanih i ukupnih p70S6K određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.

#### 4.10.2. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ kontinuirano inhibira ERK, dok SBA-15pSn indukuje prolaznu inhibiciju ovog signalnog molekula u B16 ćelijama

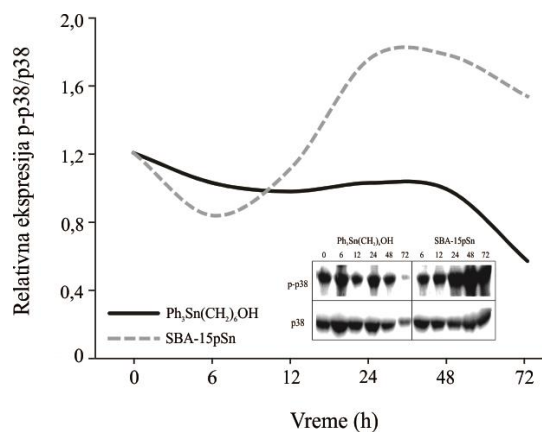
Analiza ekspresije Raf/MEK/ERK signalnog puta nakon tretmana testiranim agensima, pokazala je da  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  trajno inhibira fosforilaciju ERK1/2, dok je SBA-15pSn indukovaao potentniju ali prolaznu inhibiciju ovog signalnog molekula (Slika 30).



Slika 30 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn diferencijalno regulišu ekspresiju ERK1/2 u B16 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije ERK1/2 proteina i reprezentativni imunoblot. Ekspresija fosforilisanog i ukupnog ERK1/2 određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.

#### 4.10.3. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ uskladišten u SBA-15, ali ne i u slobodnoj formi, aktivira p38 signalni put u B16 ćelijama

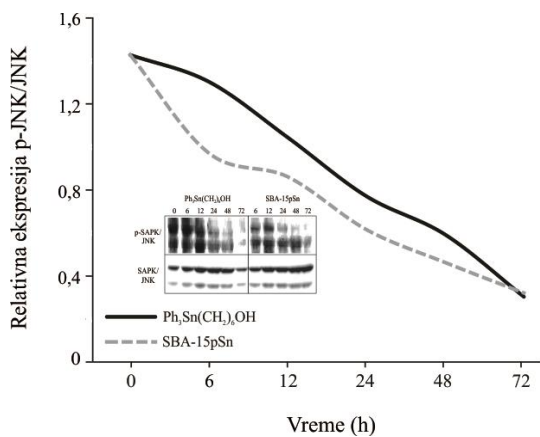
Efekat tretmana ispitivanim agensima na ekspresiju p38 signalnog molekula je dualan. Dok je  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  kontinuirano inhibirao fosforilaciju p38, SBA-15pSn je snažno aktivirao ovaj protein (Slika 31).



Slika 31 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  inhibira, dok SBA-15pSn stimuliše fosforilaciju p38 u B16 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije p38 proteina i reprezentativni imunoblot. Ekspresija fosforilisanog i ukupnog p38 određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.

#### 4.10.4. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn snažno inhibiraju SAPK/JNK signalni put u B16 ćelijama

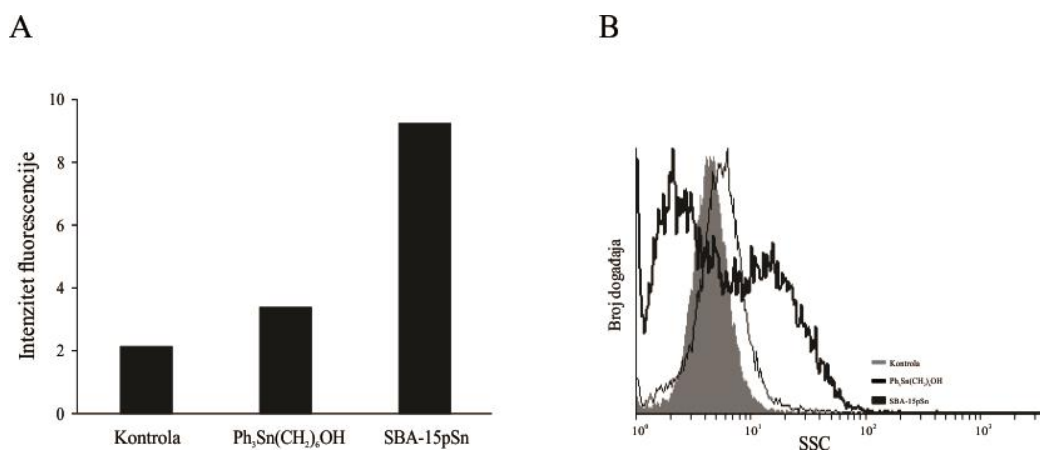
Analiza stepena fosforilacije SAPK/JNK signalnog molekula u B16 ćelijama, pokazala je da oba jedinjenja snažno inhibiraju ovaj signalni put (Slika 32).



Slika 32 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn negativno regulišu SAPK/JNK u B16 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije SAPK/JNK i reprezentativni imunoblot. Ekspresija fosforilisanog i ukupnog SAPK/JNK određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.

#### 4.11. SBA-15pSn indukuje prevremenu senescenciju A375 ćelija melanoma

Nakon što je pokazano da SBA-15pSn indukuje inhibiciju proliferacije i morfološku transformaciju A375 ćelija, pretpostavljeno je da testirani agens indukuje prevremenu senescenciju i u humanim ćelijama melanoma. A375 ćelije su inkubirane u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn tokom 96 h, bojene fluorogenim supstratom SA- $\beta$ -Gal i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Dok je ekspresija SA- $\beta$ -Gal u A375 ćelijama nakon tretmana  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  bila neznatno veća u odnosu na kontrolne ćelije, SBA-15pSn je višestruko povećao nivo ovog enzima, kao i granuliranost ćelija. Sveukupno, rezultati pokazuju da SBA-15pSn indukuje ulazak A375 ćelija u stanje prevremene senescencije (Slika 33).

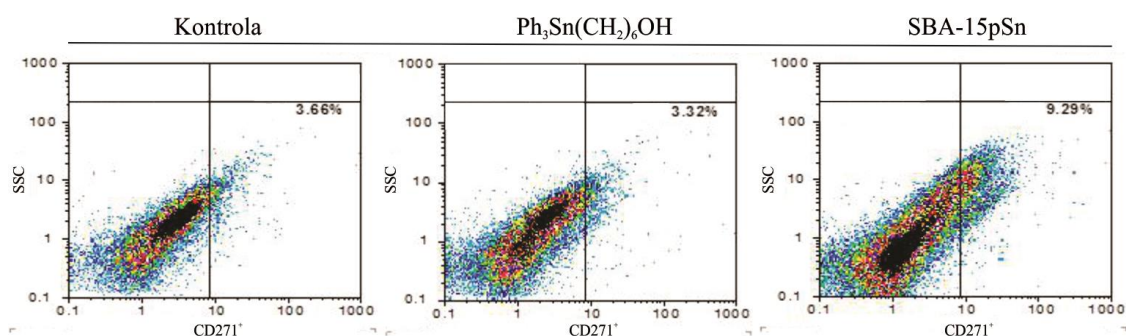


Slika 33 | SBA-15pSn indukuje prevremenu senescenciju A375 ćelija. A | Intenzitet fluorescencije i B | granuliranost A375 ćelija obeleženih FDG bojom 96 h nakon tretmana  $\text{IC}_{50}/\text{MC}_{50}$  dozom  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn određeni protočnom citofluorimetrijom prikazani su reprezentativnim histogramom.

#### 4.12. SBA-15pSn indukuje transdiferencijaciju A375 ćelija melanoma u ćelije nalik Švanovim

Analiza morfologije humanih ćelija melanoma na nivou svetlosne mikroskopije, nakon tretmana SBA-15pSn, ukazala je na prisustvo izduženih ćelija koje podsećaju na tipične Švanove ćelije vretenastog oblika. U literaturi je već opisano da pojedini citotoksični agensi mogu da indukuju transdiferencijaciju tumorskih ćelija neuroektodermalnog porekla u oligodendrocite ili ćelije nalik Švanovim (engl. *Schwann cell-like myelinating cells*)<sup>224</sup>. Ovaj fenomen je karakterističan za terminalnu diferencijaciju melanocita u nevusima, koja rekapitulira pojedine aspekte najranijih stadijuma razvika Švanovih

ćelija<sup>207</sup>. Kako bi se potvrdila transdiferencijacija A375 ćelija, analizirana je ekspresija LNGF (CD271) receptora, markera ranih stupnjeva u razviću Švanovih ćelija<sup>207,240,241</sup>. Nakon tretmana testiranim jedinjenjima, A375 ćelije su inkubirane sa fluorescentno obeleženim CD271 antitelom i analizirane protočnom citofluorimetrijom. Rezultati FACS analize su pokazali da SBA-15pSn indukuje ekspresiju CD271 receptora u A375 ćelijama melanoma (Slika 34). Na osnovu navedenih rezultata, može da se zaključi da u određenom procentu senescentnih A375 ćelija SBA-15pSn indukuje transdiferencijaciju u ćelije nalik Švanovim.

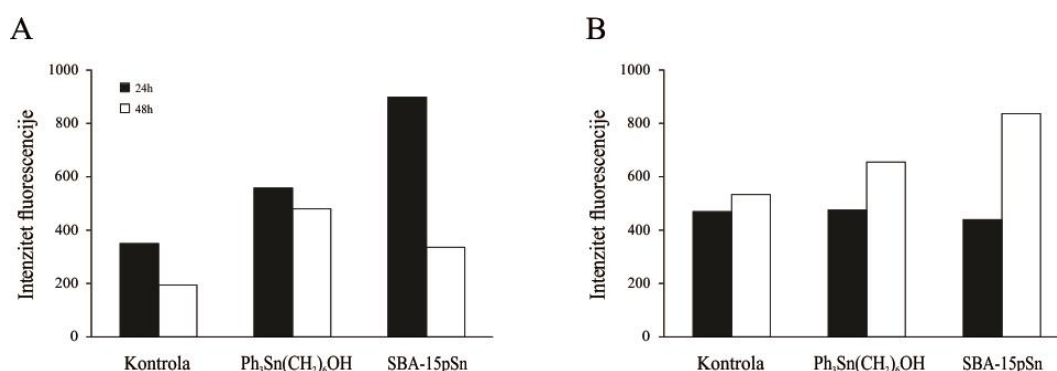


Slika 34 | SBA-15pSn indukuje ekspresiju CD271 receptora u A375 ćelijama. Procenat CD271<sup>+</sup> A375 ćelija 72 h nakon tretmana IC<sub>50</sub>/MC<sub>50</sub> dozom Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom prikazan je reprezentativnim dot plotovima.

#### 4.13. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] i SBA-15pSn stimulišu produkciju reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsti u A375 ćelijama

Konstitutivna ekspresija inducibilne azot oksid sintaze (engl. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) predstavlja izvor endogenog NO koji deluje kao faktor rasta humanih ćelija melanoma<sup>242–244</sup>. Sa druge strane, prekomerna produkcija NO može da izazove nitrozativni stres koji indukuje ćelijsku smrt povezanu sa S-nitrozilacijom apoptotskih medijatora. U biološkim sistemima postoji nitrozativni/oksidativni kontinuum, što označava da visoka koncentracija reaktivnih vrsti azota može biti praćena oksidativnim stresom<sup>245–248</sup>.

Uloga NO signalnog molekula u mehanizmu delovanja testiranih agenasa, analizirana je bojenjem A375 ćelija DAF-FM fluoroforom nakon tretmana  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn u različitim vremenskim intervalima, dok je nivo reaktivnih vrsti kiseonika i azota analiziran bojenjem ćelija DHR fluoroforom. Već 24 h inkubacije, zabeležen je značajan porast unutarćelijskog NO u kulturama koje su inkubirane u prisustvu SBA-15pSn (Slika 35A). Intenzivna produkcija ROS/RNS detektovana je u kulturama nakon 48 h tretmana testiranim jedinjenjima (Slika 35B), kao rezultat porasta nivoa NO. U celini, rezultati ukazuju da slobodni radikali verovatno posreduju indukciju prevremene senescencije A375 ćelija kao i da je deo mehanizma antitumorskog delovanja testiranih jedinjenja u ćelijama humanog melanoma indukcija nitrozativnog stresa koji inicira ćelijsku smrt apoptozom. Oksidativni stres nema primarnu efektorsku ulogu u ovom procesu, već u određenoj meri doprinosi ćelijskoj smrti.



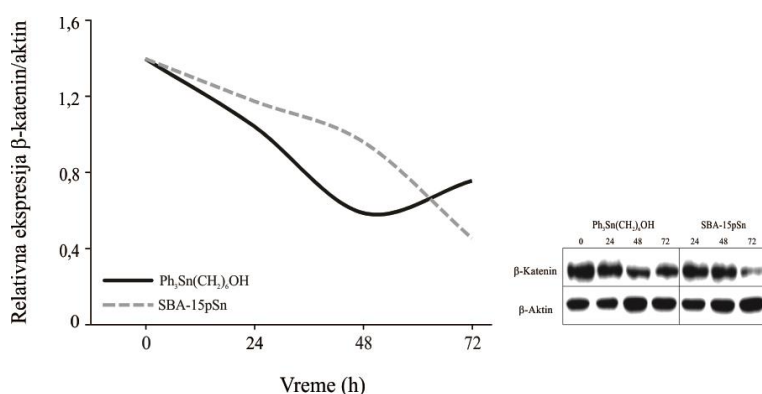
Slika 35 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn stimulišu produkciju NO i ROS/RNS u A375 ćelijama. Intenzitet fluorescencije A375 ćelija bojenih A | DAF-FM i B | DHR fluoroforom 24 h i 48 h nakon tretmana  $\text{IC}_{50}/\text{MC}_{50}$  dozom  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  ili SBA-15pSn određen protočnom citofluorimetrijom.

#### 4.14. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] i SBA-15pSn menjaju aktivnost ključnih signalnih puteva koji regulišu adheziju, migraciju i invaziju A375 ćelija

Morfološke promene A375 ćelija mogu da budu odraz promene adhezivnog profila, što se odražava na metastatski potencijal ćelija. A375 ćelijsku liniju humanog melanoma karakteriše visok stepen dediferencijacije koji se ogleda u ekspresiji markera matičnih ćelija kancera (engl. *cancer stem cells*, CSC), koji podstiču metastaze delovanjem na migraciju i invaziju ćelija<sup>249</sup>. U skladu sa tim, bilo je interesantno da se ispita uticaj testiranih jedinjenja na ekspresiju signalnih molekula koji učestvuju u embrionalnom razviću melanocita, uključujući *Wnt/β*-katenin i *Notch* signalni put, i ekspresiju Okt-3/4 transkripcionog faktora, markera dediferencijacije. Nakon tretmana Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH ili SBA-15pSn u naznačenim vremenskim intervalima, ključni signalni putevi uključeni u adheziju, migraciju i invaziju A375 ćelija analizirani su imunoblot metodom.

##### 4.14.1. [Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH] i SBA-15pSn negativno regulišu *Wnt/β*-katenin signalni put

Analiza ekspresije *β*-katenina pokazala je da Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn indukuju smanjen nivo ovog signalnog molekula u A375 ćelijama. Takođe, zabeležen je porast nivoa *β*-aktina, vrlo izražen u ćelijama koje su inkubirane u prisustvu SBA-15pSn, što je u saglasnosti sa promenom oblika i veličine A375 ćelija (Slika 36).

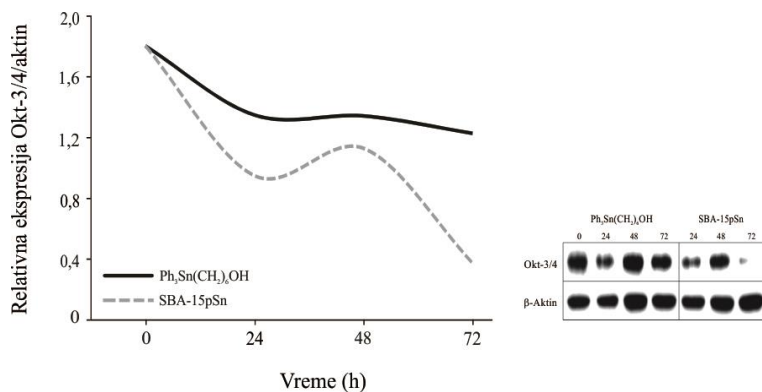


Slika 36 | Ph<sub>3</sub>Sn(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH i SBA-15pSn indukuju smanjenje ekspresije *β*-katenina u A375 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije *β*-katenina (levi panel) i reprezentivni imunoblot (desni panel). Ekspresija *β*-katenin proteina određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.



#### 4.14.2. SBA-15pSn negativno reguliše ekspresiju Okt-3/4 transkripcionog faktora

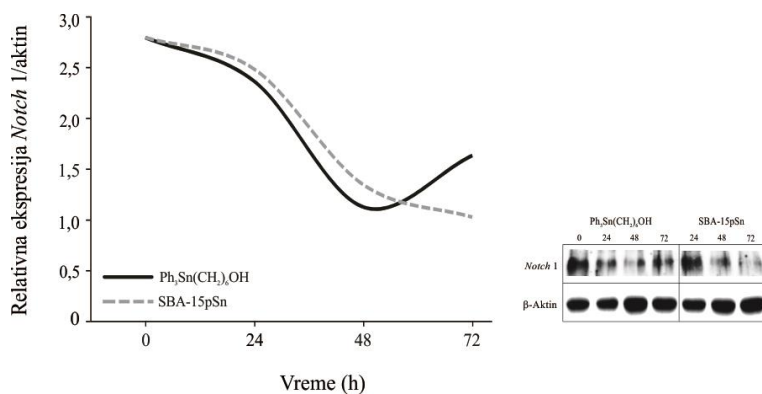
Analiza ekspresije Okt-3/4 markera dediferencijacije u A375 ćelijama, pokazala je da  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  neznatno smanjuje nivo ovog transkripcionog faktora, dok je SBA-15pSn u potpunosti inhibirao ekspresiju Okt-3/4, što je u saglasnosti sa fenotipskim promenama A375 ćelija u smeru transdiferencijacije u ćelije nalik Švanovim (Slika 37).



Slika 37 | SBA-15pSn indukuje smanjenje ekspresije Okt-3/4 markera u A375 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije Okt-3/4 (levi panel) i reprezentativni imunoblot (desni panel). Ekspresija Okt-3/4 proteina određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.

#### 4.14.3. $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$ i SBA-15pSn negativno regulišu *Notch* signalni put

Analiza ekspresije *Notch* 1 receptora pokazala je da  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u slobodnoj formi i nanešen na SBA-15 inhibira *Notch* signalni put u A375 ćelijama (Slika 38).



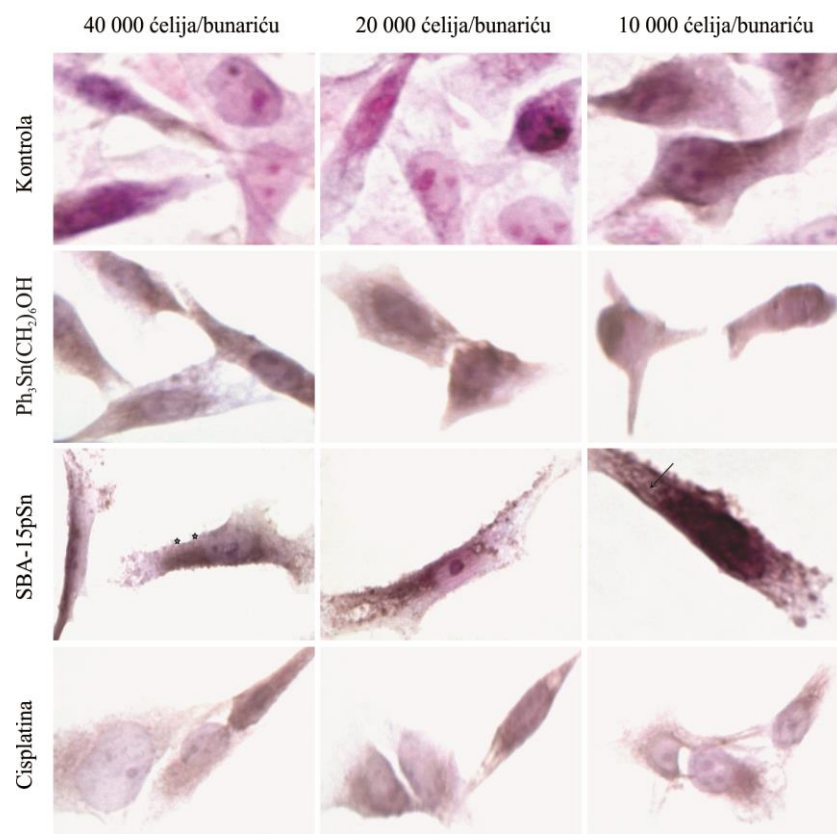
Slika 38 |  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i SBA-15pSn indukuju smanjenje ekspresije *Notch* 1 receptora u A375 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije *Notch* 1 (levi panel) i reprezentativni imunoblot (desni panel). Ekspresija *Notch* proteina određena je imunoblot metodom u naznačenim vremenskim intervalima.

U celini, rezultati analize signalnih puteva koji su važni tokom razvića melanocita i koji su reaktivirani u melanomu, pokazuju da testirani agensi inhibiraju ključne molekule odgovorne za invaziju i diseminaciju ćelija melanoma.

#### 4.15. SBA-15pSn ukida međućelijsku komunikaciju A375 ćelija

Metastatski potencijal A375 ćelija u korelaciji je sa ćelijskom morfologijom<sup>189</sup>. A375P ćelijsku liniju karakteriše mešoviti fenotip, ćelije ovalne morfologije sa ameboidnim tipom pokretljivosti i izdužene morfologije sa mezenhimalnim tipom pokretljivosti koji zahteva aktivnost ekstraćelijskih proteaza. Pokazano je da ovalna morfologija favorizuje metastatsku kolonizaciju. Dok roditeljska linija ima mešoviti fenotip, metastatske A375 ćelijske linije imaju pretežno ovalni/ameboidni fenotip. Približno 90% A375M2 ćelija i blizu 60% A375P ćelija ima ovalnu morfologiju<sup>250,251</sup>.

Nakon što je pokazano da testirani agensi negativno regulišu signalne molekule koji su odgovorni za adheziju i migraciju A375 ćelija, bilo je interesantno se ispita u kojoj meri ovi rezultati koreliraju sa morfološkim promenama i da li one utiču na komunikaciju humanih ćelija melanoma. Kulture A375 ćelija melanoma različitih gustina inkubirane su u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili cisplatine tokom 72 h, nakon čega su bojene hematoksilinom i eozinom i analizirane na nivou svetlosne mikroskopije. Dok je u kontrolnim bunarićima vidljivo da ćelije formiraju mnoštvo međućelijskih kontakata putem brojnih ćelijskih nastavaka, A375 ćelije inkubirane u prisustvu SBA-15pSn imaju izduženu morfologiju i ne uspostavljaju kontakte, čak ni u konfluentnim kulturama. Na membrani se uočavaju filopodije i bogata mreža aktinskih filamenata u citoplazmi. Nasuprot tome, ćelijska komunikacija u gustim kulturama nije narušena u prisustvu  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ . Efekat cisplatine nije zavisio od brojnosti kulture, što ukazuje da ovaj lek ne utiče na međućelijsku komunikaciju.  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  i cisplatina nisu imali efekat na morfologiju ćelija; udeo ćelija sa ovalnom i vretenastom morfologijom ostao je nepromenjen (Slika 39). Eksperiment sa gradijentom gustine kulture humanih ćelija melanoma pokazao je da SBA-15pSn onemogućava međusobnu komunikaciju A375 ćelija, i povećava zastupljenost ćelija sa izduženom morfologijom, što je u saglasnosti sa rezultatima analize ekspresije signalnih molekula koji regulišu adheziju i migraciju ćelija melanoma.



Slika 39 | SBA-15pSn ukida međućelijske kontakte A375 ćelija i povećava zastupljenost ćelija sa izduženom morfologijom. Reprezentativne mikrografije na nivou svetlosne mikroskopije kultura A375 ćelija različitih gustina obojenih H&E 72 h nakon tretmana  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ , SBA-15pSn ili cisplatinom; filopodije (\*) i mreža aktinskih filamenata (→). Uvećanje:  $\times 40$ , orig.

## 5. DISKUSIJA

Evolucija normalne ćelije u neoplastični fenotip podrazumeva reprogramiranje ćelijskih puteva važnih tokom razvića<sup>252</sup>. Ovi signalni putevi kontrolišu koordinisane procese tokom embriogeneze i tkivne homeostaze, kao što su proliferacija, migracija, apoptoza i diferencijacija. U skladu sa Darvinovim principima, kancer evoluirao putem slučajnih mutacija i epigenetičkih promena koje menjaju ove puteve, nakon čega sledi klonaska selekcija ćelija koje mogu da prežive i dele se u uslovima koji bi za normalnu ćeliju bili letalni. Kompleksnost promena predstavlja glavni izazov u terapiji ove bolesti<sup>252</sup>. Ćelije kancera poseduju složenu mrežu signalnih puteva koja se nalazi u osnovi malignog fenotipa. Ključ uspešne terapije kancera je identifikacija kritičnih čvorova u onkogenoj mreži, čija inhibicija rezultuje *padom sistema*, odnosno nestankom tumorigenog fenotipa procesom apoptoze, nekroze, senescencije ili diferencijacije<sup>252</sup>. Metastaza, rast tumorskih ćelija na novom mestu u organizmu, predstavlja najporazavajući aspekt ove bolesti<sup>253</sup>. Sposobnost formiranja agresivnih metastaza je usko povezana sa osobenim profilom ekspresije definisanog seta gena koji predstavlja *metastatski potpis*, zajednički za mnoge tipove tumora. Metastaze zahtevaju set funkcija koje prevazilaze one u osnovi pojave primarnog tumora<sup>254,255</sup>. U skladu sa tim, metastaze mogu da se pojave decenije nakon naizgled uspešne terapije primarnog tumora, što je zabeleženo u melanomu<sup>256</sup>. Smanjenje veličine tumora kao tradicionalna mera kliničkog odgovora, nije relevantno kada se evaluiraju lekovi dizajnirani da deluju na diseminaciju i rast ćelija kancera na metastatskim mestima. Sa druge strane, metode koje se koriste za praćenje morfologije i pokretljivosti ćelija, funkcije proteaza, integriteta vaskularne mreže, aktivnosti signalnih puteva, zatim interakcija sa ćelijama strome, u značajnoj meri bi unapredili prekliničku evaluaciju novih jedinjenja i efikasnosti potencijalnih antimetastatskih terapija<sup>257</sup>.

Agensi koji indukuju promene na DNK, kao deo konvencionalne hemoterapije, nisu pokazali efikasnost u terapiji metastatskog melanoma. Među njima je i cisplatina, jedan od najčešće korišćenih hemoterapeutika<sup>258</sup>. Primenu platinskih lekova u hemoterapiji ograničava urođena ili stečena rezistencija. Za melanom je karakteristična urođena rezistencija na cisplatinu, posredovana brojnim mehanizmima, uključujući povećani refleks, inaktivaciju sulfhidrilnim molekulima kao što je glutation, izmenjenu ekspresiju signalnih molekula koji regulišu apoptozu, kao i povećanje ekspresije gena za reparaciju DNK. Alkilirajući agens dekarbazin, standardni izbor u terapiji metastatskog melanoma, takođe daje loše rezultate. Kombinacija hemoterapeutika, kao što je *Dartmouthov* režim,

neznatno povećava stopu odgovora, što naglašava potrebu za pronalaženjem efikasnijeg pristupa u terapiji melanoma<sup>258,259</sup>. Od početka primene cisplatine u terapiji kancera, metalni kompleksi i organometalna jedinjenja imaju sve veći značaj u onkologiji<sup>146</sup>. Kompleksi rutenijuma i galijuma predstavljaju najznačajnija neplatinska koordinaciona jedinjenja sa antitumorskom aktivnošću. Jedinjenja zlata i kalaja, kojima je zajednički afinitet za tiolne grupe proteina i enzima, ranije nisu smatrani ozbiljnim kandidatima<sup>146</sup>. Međutim, zahvaljujući delovanju na sintezu makromolekula i energetske metabolizam ćelija, organokalajna jedinjenja postaju sve interesantniji kao potencijalni antitumorski lekovi, aktivni u terapiji kancera rezistentnih na cisplatinu<sup>146</sup>. Nedovoljna rastvorljivost organokalajnih jedinjenja predstavlja ozbiljan nedostatak i suštinsku prepreku u daljim prekliničkim ispitivanjima, posebno u modelima *in vivo*. Još jedan ograničavajući faktor je toksičnost organokalajnih jedinjenja, kao što su neuro- i hepatotoksičnost<sup>260,261</sup>.

Ćelije kancera dele mnoge osobine sa normalnim ćelijama. Shodno tome, visok nivo selektivne toksičnosti ne može da se postigne antikancerskim hemoterapeutcima, zbog nedostatka jedinstvenih molekulskih meta na tumorskim ćelijama<sup>262</sup>. Hemoterapeutici koji se danas primenjuju u terapiji kancera su delimično selektivni, zahvaljujući većoj stopi proliferacije tumorskih ćelija. Nuspojave koje su rezultat toksičnosti terapije u zdravim tkivima, zahtevaju primenu hemoterapeutika u suboptimalnim dozama, što rezultuje neuspehom terapije, razvojem rezistencije i metastatske bolesti. Selektivna toksičnost leka može da se postigne ili povećavanjem doze leka u obolelom tkivu, zatim smanjenjem doze koja doseže normalna tkiva, ili u idealnom slučaju, postizanjem oba efekta<sup>262</sup>. Primena novih tehnologija za povećanje selektivne toksičnosti antikancerskih lekova ima sve veću ulogu u farmaceutskom sektoru za istraživanje i razvoj, primarno u formi sistema za isporuku lekova baziranih na nanočesticama<sup>263</sup>. Terapeutici mogu biti stabilno vezani za mikrozervoare, koji su dovoljno mali u prečniku, kako bi omogućili ekstravazaciju u oblastima povećanog vaskularnog permeabiliteta u tumoru. Rezultat je značajno povećanje količine leka u tumorskom tkivu u odnosu na slobodni lek. U isto vreme, maksimalna koncentracija i distribucija leka u normalnim tkivima je smanjena, što ograničava sistemsku toksičnost<sup>262</sup>. Uprkos tolikoj pažnji, tehnologije za ciljanu isporuku bazirane na ligand-receptor interakcijama nisu postigle predviđeni učinak<sup>264</sup>. Sve je više dokaza koji ukazuju da prisustvo liganda stimuliše imunske eliminaciju, što negativno utiče na fenomen pasivne akumulacije nanočestica<sup>264</sup>. Pored toga, konjugacija

za nanočestice može da umanja specifičnost liganda<sup>265</sup>. Ovi izazovi su doveli u pitanje vrednost uvođenja liganada za aktivnu isporuku leka, posebno zato što je klinički razvoj kompleksnih nanosistema komplikovan i skup<sup>266</sup>. Adsorpcija na nosače velike površine je poznata tehnika za povećanje rastvorljivosti lekova. Najnovija strategija bazirana na ovom rešenju je inkapsulacija hidrofobnih lekova u uređene mezoporozne materijale silike<sup>267</sup>. Zbog velikog kapaciteta za adsorpciju, relativno širokog prečnika pora (30nm), kao i hidrotermalne stabilnosti, SBA-15 je najinteresantniji mezoporozni silikat<sup>171</sup> za poboljšanje kinetike rastvaranja<sup>267</sup>. Interakcije između hidrofobnih molekula leka i silanol grupa ne utiču na kinetiku oslobađanja leka, već vreme potrebno za difuziju iz unutrašnjosti pora, što je funkcija veličine silika čestica i prečnika pora<sup>267</sup>. Molekuli leka se efikasno desorbuju zahvaljujući kompetitivnoj adsorpciji sa molekulima vode, zbog hidrofilnosti silike<sup>268</sup>. Iako fizička priroda leka u mezoporama nije u potpunosti razjašnjena, poznato je da se termodinamičke osobine molekula koji su zarobljeni u poroznim materijalima značajno menjaju. Nekoliko studija je ukazalo da, smanjenjem kritičnog prečnika pora, molekuli leka više nisu u mogućnosti da formiraju kristalnu rešetku<sup>267</sup>. Visok farmaceutski učinak SBA-15 materijala može da se pripíše potpunom gubitku kristalnih svojstava adsorbovanih molekula, koje karakteriše stanje molekulske disperzije. Odvajanje molekula leka na površini SBA-15, raskidanjem intermolekulskih interakcija u kristalnoj strukturi je ključ prevazilaženja spore kinetike rastvaranja<sup>267,268</sup>. Relativno niska cena sinteze SBA-15 i jednostavan proces vezivanja leka je važan u kontekstu budućih kliničkih zahteva i komercijalizacije<sup>170</sup>.

U skladu sa već pokazanim potencijalom SBA-15 nanosistema za ciljanu isporuku da značajno povećava efikasnost i redukuje toksičnost hidrofobnih antikancerskih agenasa, čime se uspostavlja kontrola nad biodistribucijom leka i farmakokinetikom, u ovoj studiji je ispitan terapijski potencijal SBA-15pSn u modelu melanoma *in vitro* i *in vivo*. Nanomaterijal ispitan u ovoj studiji, poseduje daleko snažniji *in vitro* efekat od titanocena i *ansa*-titanocena skladištenih u SBA-15 mezoporoznoj siliki i predstavlja do sada najaktivniji nanomaterijal koji sadrži jedinjenje na bazi metala<sup>181,215–217</sup>.



Prvi rezultati studije su potvrdili izuzetan antitumorski potencijal organokalajnih(IV) jedinjenja.  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u slobodnoj formi i vezan za materijal SBA-15, indukovao je dozno-zavisan pad vijabiliteta ćelijskih linija mišjeg i humanog melanoma u sistemu *in vitro*. Adsorpcija na SBA-15 je povećala efikasnost organokalajnog jedinjenja, jer je višestruko manjom dozom od primenjene doze jedinjenja u slobodnoj formi, ostvaren podjednak citotoksični efekat. SBA-15 nanomaterijal nije toksičan za ćelije; rast ćelija melanoma koje su inkubirane sa SBA-15 bio je sličan kontrolnim ćelijama. Povećanje terapijske efikasnosti testiranog jedinjenja, potvrđeno je u singenom modelu mišjeg melanoma. Primena  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  skladištenog u SBA-15 materijal, indukovala je značajno veću regresiju tumora u poređenju sa jedinjenjem u slobodnoj formi. Takođe, pokazano je znatno efikasnije dejstvo testiranog jedinjenja u poređenju sa tretmanom cisplatinom, koja ostvaruje slab efekat u terapiji melanoma usled urođene rezistencije ovog tipa tumora na cisplatinu<sup>258</sup>. Analizom parametara nefrotoksičnosti pokazano je da SBA-15pSn ne utiče na funkciju bubrega. U celini, rezultati *in vivo* studije su pokazali superioran terapijski potencijal SBA-15pSn u odnosu na komercijalni hemoterapeutik iz grupe jedinjenja na bazi metala. Početni rezultati ove studije su takođe pokazali da adsorpcija na ovaj tip nosača, elegantno rešava problem nerastvorljivosti testiranog agensa, što ovoj grupi jedinjenja otvara vrata kliničkim ispitivanjima.

Proteklih nekoliko godina, publikovane su brojne *in vivo* studije u kojima su testirane MSN u isporuci lekova, sa ciljem da dokažu primenljivost ideje (engl. *proof-of-concept studies*)<sup>160</sup>. Selekcija MSN nanovektora na osnovu strogih kriterijumima tek je polovina bitke za uspešna preklinička ispitivanja. Naime, sisteme bazirane na nanočesticama treba upoređivati ne samo sa lekovima u slobodnoj formi, već i sa odobrenim sistemima za isporuku koji sadrže dati terapeutik. Na taj način se istraživanja usmeravaju u okviru farmaceutskih trendova<sup>160</sup>. Smatra se da optimizacija sistema za isporuku *per se*, eksperimentisanjem sa veličinom i funkcionalizacijom, mora da prati progres u drugim disciplinama u potrazi za novim terapijskim agensima, zatim molekulskim markerima i metama, kao i novim osobinama postojećih terapeutika, sa ciljem da postignu što veću efikasnost u terapiji kancera<sup>160</sup>. Studije u sistemu *in vivo* su do sada uglavnom bile fokusirane na isporuku komercijalnog leka doksorubicina<sup>269–272</sup>. Meng i saradnici su pokazali da vezivanje doksorubicina za MSN, povećava terapijsku efikasnost leka u ksenograft modelu humanog skvamoznog karcinoma<sup>270</sup>. Regresija tumora je bila

značajno veća u poređenju sa doksorubicinom u slobodnoj formi. Poboljšana efikasnost pasivne isporuke leka, zahvaljujući EPR efektu, bila je praćena značajnom redukcijom sistemskih neželjenih efekata, kao što su gubitak težine životinja, hepatična i renalna toksičnost<sup>270</sup>. Takođe, kamptotecin je pokazao izuzetan antitumorski potencijal u kliničkim ispitivanjima, ali su zbog nedovoljne rastvorljivosti i toksičnosti razvijeni različiti analozi ovog hemoterapeutika, kao što su topotekan i irinotekan, koji se danas primenjuju u hemoterapiji kancera<sup>160</sup>. U studiji grupe Tamanoi i saradnika, testiran je efekat vezivanja kamptotecina za MSN, ubrizganjem u repnu venu miševa sa MCF-7 kancerom dojki. Rast tumora je efikasno suprimiran u meri koja je premašila delovanje slobodnog leka<sup>273</sup>. Zatim, Li i saradnici su pokazali poboljšanje aktivnosti i smanjenje sistemske toksičnosti docetaksela inkapsuliranog u MSN nanočestice obložene PEG polimerom u mišjem modelu kancera jetre<sup>274</sup>. Opšte je mišljenje da ovaj spektar lekova treba da obuhvata nova jedinjenja, lekove u kliničkim ispitivanjima ili koji su isključeni sa tržišta zbog ozbiljnih neželjenih efekata. Sa takvim pristupom može da se predvidi realna klinička korist<sup>160</sup>.

Iako su biološki učinak i primenljivost MSN pokazani u prekliničkim ispitivanjima, još uvek nedostaje sistemsko testiranje biodistribucije, bezbednosti i terapijske efikasnosti različitog dizajna čestica, kako bi se tehnologija približila kliničkim ispitivanjima<sup>160</sup>. Za biomedicinsku primenu, nanočestice bi trebalo da ostvare funkciju bez nespecifičnih promena na telu. Iako je generalno prihvaćeno da silika nema toksična svojstva, smatra se da je potrebna dodatna procena biokompatibilnosti MSN, kao nove vrste materijala. Procena biokompatibilnosti MSN podrazumeva analizu svih štetnih i korisnih bioloških efekata, uključujući: citotoksičnost, *in vivo* toksičnost, kao i promene na molekulskom, ćelijskom i organskom nivou<sup>170</sup>. Kompatibilnost nanočestica je direktno povezana sa njihovom biotranslokacijom, uključujući *in vitro* mehanizam i kinetiku ćelijskog preuzimanja, unutarćelijsko premeštanje, zatim *in vivo* biodistribuciju, metabolizam i ekskreciju. Fizičko-hemijske osobine kao što su veličina, oblik, struktura i površinske modifikacije imaju ključnu ulogu u biokompatibilnosti čestica<sup>170</sup>. Trenutna istraživanja na polju biomaterijala svedoče o nastajanju novih parametara dizajna, uključujući fizički oblik koji ima važnu ulogu u regulaciji biološkog odgovora<sup>275,276</sup>. Identifikacija signalnih puteva koji kontrolišu ovaj fenomen važna je za razumevanje na koji način varijacije oblika čestica mogu da se iskoriste za modulaciju ćelijske funkcije<sup>277</sup>. Prema

teorijskom modelu preuzimanja čestica koji opisuje na koji način oblik čestica utiče na endocitozu, uveden je koncept *vreme umotavanja*, kako bi se objasnila brža endocitoza čestica sfernog oblika u odnosu na cilindrične<sup>278</sup>. Prema drugom modelu, anizotropija oblika i inicijalna orijentacija čestica su ključne za interakciju sa membranom ćelija<sup>279</sup>. U izvesnoj meri, ovi teorijski modeli pružaju korisne smernice u dizajniranju sistema za isporuku. Ipak, smatra se da predloženi modeli ne obuhvataju specifične varijacije između ćelijskih tipova, koje utiču na endocitotske puteve zbog različite ekspresije receptora na ćelijskim linijama. Time može delom da se objasni zašto eksperimentalni rezultati ponekad nisu u skladu sa teorijskim modelima<sup>170</sup>. Naime, sve je više dokaza da sferni nosači možda nisu optimalni sistemi za isporuku lekova zbog slabog preuzimanja i nezadovoljavajuće biodistribucije u poređenju sa česticama u obliku diska ili štapića. U brojnim studijama je pokazano povećanje obima i stope ćelijskog preuzimanja čestica koje nisu sfernog oblika. Eksperimentalne studije su potvrdile prednost nesfernih čestica za ciljanu isporuku lekova na osnovu efekta na ćelijsku internalizaciju i vaskularnu dinamiku<sup>218,277,280,281</sup>. Dizajn *pametnih* funkcionalnih nanosistema za terapijsku primenu zahteva temeljno razumevanje mehanizama preuzimanja nanočestica. Za biološku i kliničku primenu, sposobnost kontrole i manipulacije nakupljanja nanočestica u ćeliji putem specifičnog ćelijskog preuzimanja, omogućava poboljšanje dijagnostičke osetljivosti i terapijske efikasnosti<sup>218</sup>. Do sada, istraživanja o efektima oblika MSN su uglavnom bila fokusirana na *in vitro* ćelijsko preuzimanje<sup>218,277,280,282–284</sup>. Interesantno, iako još uvek nisu identifikovani ćelijski receptori za siliku, preuzimanje se uglavnom odvija klatrin-posredovanim endocitotskim putevima ili makropinocitozom, što se posebno odnosi na funkcionalizovane MSN čestice<sup>169</sup>. Naša mikroskopska studija na A375 ćelijama melanoma, jasno pokazuje da se preuzimanje štapićastih SBA-15pSn nanočestica odvija pasivnim putem ili makropinocitozom. U brojnim studijama je već pokazana prednost preuzimanja nanočestica makropinocitozom, kao i povezanost mehanizma preuzimanja i oblika čestica, pri čemu je pokazano da se čestice štapićastog oblika preuzimaju efikasnije makropinocitozom u odnosu na čestice sfernog oblika. Naime, u studiji grupe Nel i saradnika, gde je upoređivan mehanizam preuzimanja MSN čestica sfernog i štapićastog oblika<sup>277</sup>, pokazano je da HeLa i A549 ćelijske linije kancera, preuzimaju MSN štapićastog oblika, intermedijerne dužine, u mnogo većoj količini od ostalih čestica MSN, makropinocitozom posredovanom aktivnošću malih

GTPaza, na osnovu prisustva filopodija i makropinocitotskih vezikula. MSN štapići indukuju polimerizaciju aktina i formiranje filopodija, a jedan od signalnih mehanizama uključuje aktivaciju malog G proteina *Rac1*, koji ima ulogu u promenama citoskeleta, nabiranju membrane i zatvaranju makropinozoma. U svetlu olakšanog ćelijskog preuzimanja procesom makropinocitoze, autori su dalje upoređivali citotoksični efekat hidrofobnih hemoterapeutskih agenasa paklitaksela i kamptotecina vezanih za sferne i štapićaste nanočestice MSN. Štapići su očigledno bili efikasniji u isporuci hidrofobnih agenasa i pokazali optimalan citotoksični efekat na HeLa ćelijama<sup>277</sup>. Makropinocitoza predstavlja efikasan put za neselektivnu internalizaciju solubilnih makromolekula<sup>285</sup>. Preuzimanje čestica makropinocitozom podrazumeva formiranje velike endocitotske vezikule nepravilnog oblika i veličine koja nastaje evaginacijama plazma membrane u formi nabiranja, što je posredovano aktivacijom aktina i mikrofilamenata vezanih za plazma membranu<sup>285</sup>. Nabiranje membrane se javlja u formi planarnih nabora ili lamelipodija, zatim kružnih membranskih nastavaka i membranskih ispučenja ili mehurića. Dinamični pokreti membrane rezultiraju formiranjem endocitotske vakuole ili makropinozoma. Makropinocitozu obično iniciraju faktori rasta koji aktiviraju signalnu kaskadu koja, za uzvrat, indukuje promene u dinamici aktinskih filamenata i nabiranje plazma membrane<sup>285</sup>. Doprinosi različitim ćelijskim funkcijama kao što su preuzimanje nutrijenata, interakcije sa patogenima, procesovanje antigena i pokretljivost ćelija<sup>286,287</sup>. Makropinocitoza dobija sve veći značaj zbog uloge u imunskoj odbrani i uklanjanju apoptotskih tela. Naime, različite čestice uključujući bakterije, viruse, nekrotske ćelije i apoptotska tela mogu da indukuju nabiranje membrane nezavisno od faktora rasta. Ovo omogućava preuzimanje velikih čestica u ćelije koje nemaju sposobnost fagocitoze<sup>285</sup>. Razlikuje se od ostalih endocitotskih mehanizama koji su uključeni u preuzimanje pojedinačnih nanočestica manjim vezikulama, što povećava interes za makropinocitozu kao mehanizam isporuke terapeutika u ćelije<sup>285,286</sup>.

U ovom radu, inkubacija A375 ćelija melanoma u različitim vremenskim intervalima, omogućila je praćenje sleda događaja od ulaska u ćeliju, kao i unutarćelijske sudbine čestica. Naime, ultrastrukturalna studija je pokazala stabilnu adheziju SBA-15pSn čestica za ćelijsku membranu pre ulaska u ćeliju. Priroda interakcija između nanomaterijala i bioloških sistema utiče na *in vivo* biokompatibilnost i toksičnost nanočestica<sup>276</sup>. U tom kontekstu, pokazano je da silanol grupe na površini mezoporoznih nanočestica silike

interaguju sa membranskim fosfolipidima i sa naelektrisanim proteinima membrane<sup>288-291</sup>. Spontana fuzija lipidnih vezikula na staklu, siliki, i sličnim polarnim strukturama, bila je predmet opsežnog istraživanja<sup>292</sup>. Međutim, postoji vrlo malo eksperimentalnih podataka koji se tiču ponašanja membrane na zakrivljenim površinama. Pokazano je da se uspostavljaju stabilne elektrostatičke interakcije između zakrivljene površine silike i lipidnog dvosloja ako je površina silike u kontinuitetu više od 22 nm, tako da stres koji nastaje savijanjem lipidnog dvosloja može da se prevaziđe velikim brojem interakcija između silanol grupa i polarnih glava fosfolipida. Drugim rečima, lipidna membrana prati topografiju supstrata na ovoj skali. U suprotnom, nepovoljna energija savijanja membrane u odnosu na adhezivnu energiju rezultuje lokalnim formiranjem pora<sup>288,293</sup>. Relativno velika spoljašnja površina krupnih SBA-15 čestica, podrazumeva da poseduju i veću energiju vezivanja dostupnu za povlačenje membrane ka površini nanočestice. Pored toga, zakrivljenost površine se smanjuje sa veličinom silika čestice, tako da je adhezija i *umotavanje* velikih čestica SBA-15 termodinamički povoljnije, jer je energija savijanja membrane manja u poređenju sa manjim česticama<sup>294</sup>. Vrlo verovatno da, ukoliko je savijanje membrane ćelija melanoma prilikom pasivnog ulaska SBA-15pSn čestica termodinamički nepovoljno, ćelija počinje da formira filopodije kako bi preuzela adherirane čestice makropinocitozom.

Postavlja se pitanje na koji način ćelije prepoznaju razlike u obliku čestica i kako se one prevode u promene citoskeleta i efikasniji mehanizam preuzimanja. Progres dizajna i primene veštačkih ćelijskih mikrosredina i nanosredina, otkrio je izvanrednu sposobnost ćelije da prilagodi oblik i pokretljivost promenama u neposrednoj okolini<sup>295</sup>. Adhezivni kompleksi bazirani na integrinu koji su povezani sa aktinskim citoskeletom prepoznaju, ne samo biohemijski diverzitet vanćelijskog susedstva, već fizičke i topografske osobine uključujući rigitet, prostornu organizaciju i anizotropiju vanćelijskog matriksa. Ćelija *oseća* okolinu, odgovara na širok spektar spoljašnjih signala, integriše i analizira ove informacije, mnoge osobine koje se pripisuju inteligentnim sistemima. Kao rezultat, može da menja morfologiju, dinamiku i ponašanje<sup>295</sup>. Biološke aktivnosti komponenti adhezoma su dosta raznolike i obuhvataju adapterske proteine koji povezuju aktin sa integrinima kao i širok spektar signalnih molekula, uključujući kinaze, fosfataze, G proteine i regulatorne proteine<sup>295,296</sup>. Smatra se da ovaj model može da objasni različit odgovor ćelija na varijacije nanomaterijala. Varijacije u obliku čestica, ćelije detektuju

na mestu kontakta sa membranom. Broj i prostorna distribucija ovih kontakata prevode se u informacije koje se prenose do malih GTPaza putem koji uključuje vezivanje GTP faktorom razmene guaninskih nukleotida ili inhibiciju aktivnosti GTPaze<sup>277</sup>.

Dalje, nakon preuzimanja SBA-15pSn vidljivo je da su nanočestice uspele da napuste endozom i da su ravnomerno distribuirane u ćeliji. Preraspoređivanje u svim ćelijskim odeljcima podrazumeva da se jedinjenje otpušta u ciljnim mestima delovanja. Idealan *state-of-the-art* nanosistem za isporuku lekova ima sposobnost *bega* iz endozomalnog odeljka i degradacije nakon otpuštanja terapeutika. Ove osobine mogu da se postignu funkcionalizacijom i podešavanjem veličine i morfologije čestica<sup>297</sup>. Lin i saradnici su pokazali da funkcionalizacijom mogu da kontrolišu efikasnost preuzimanja MSN, kao i mogućnost *bega* iz endozoma. Manipulacijom površinskog električnog potencijala (zeta potencijal) između dvostrukog sloja, pokazali su da MSN čestice mogu lako da *pobegnu* iz endozomalnog odeljka. Ovaj fenomen (engl. *proton sponge effect*) se može pripisati osmotskom pritisku koji produkuje velika gustina jona na površini MSN<sup>169,298</sup>. Tamanoi i saradnici su takođe zaključili da internalizovani MSN mogu brzo da *pobegnu* iz endozomalnih vezikula u citoplazmu, odupru se lizosomalnoj degradaciji, i na taj način zaštite vezani lek od bioerozije<sup>299</sup>.

Defekti u mehanizmima programirane ćelijske smrti predstavljaju fundamentalni aspekt biologije kancera. Ćelijski tip i tkivo imaju značajan uticaj na rane faze tumorigeneze zato što različita tkiva koriste različite strategije za ograničavanje ćelijske ekspanzije. Za većinu tkiva, apoptoza je glavni mehanizam uklanjanja fiziološkog *viška* ćelija, koji postaje nefunkcionalan tokom progresije tumora<sup>300,301</sup>. Kada se govori o uspešnoj eliminaciji ćelija kancera nehirurškim putem, svi putevi vode do apoptoze. Većina citotoksičnih antikancerskih lekova u kliničkoj primeni danas, indukuje apoptozu tumorskih ćelija<sup>301</sup>. Paradoksalno, zahvaljujući onkogenom *prajmiranju* tumor je u početku podložniji indukciji apoptoze od normalnih ćelija. Ova urođena osetljivost je osnova postojećih antikancerskih terapija. Nažalost, inicijalna osetljivost genetički plastične tumorske ćelije vrlo brzo nestaje pod selektivnim pritiskom terapije. Evolucija tumora favorizuje usvajanje specifičnih puteva supresije apoptoze. Rezultat je česta pojava hemorezistencije<sup>300</sup>. U skladu sa tim, u ovoj studiji je pokazano da je u osnovi citotoksičnog efekta  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u slobodnoj formi i skladištenog u SBA-15, na

B16 i A375 ćelijskoj liniji melanoma, jednim delom indukcija apoptoze posredovana aktivacijom kaspaza. U brojnim studijama je već pokazano da je deo mehanizma delovanja organokalajnih jedinjenja indukcija apoptoze<sup>143,144,182,302,303</sup>. Kaluđerović i saradnici su pokazali izuzetan citotoksični potencijal trifenilkalajnih(IV) kompleksa sa hlorido i karboksilato ligandima na pet humanih ćelijskih linija kancera<sup>182</sup>. Najaktivnije jedinjenje je indukovalo put apoptoze posredovan receptorima smrti na DLD-1 ćelijskoj liniji kancera kolona. U studiji Ott i saradnika, pokazano je da butilkalaj(IV) benzoati indukuju apoptozu u BJAB ćelijskoj liniji limfoma<sup>144</sup>. U tom smislu, autori smatraju da je butilkalajni(IV) fragment aktivna farmakofora, dok ligandi imaju sekundarnu ulogu u biološkoj aktivnosti ovih kompleksa<sup>144</sup>. Testirana organokalajna jedinjenja su snažni inhibitori TrxR, što najverovatnije donekle doprinosi toksičnom profilu jedinjenja. Ipak, autori zaključuju da je malo verovatno da inhibicija TrxR predstavlja glavni mehanizam delovanja ove grupe metalnih jedinjenja, s obzirom na izuzetno visoku citotoksičnost posredovanu apoptotskim mehanizmima. Pretpostavlja se da je oksidativni stres glavni medijator apoptoze indukovane organokalajnim jedinjenjima na ćelijskim linijama kancera<sup>146</sup>.

Zatim, u ovoj studiji je pokazano da apoptotski odgovor ćelija melanoma upotpunjuje snažna indukcija prevremene ćelijske senescencije, iako, barem po našim saznanjima u literaturi još uvek nema podataka da jedinjenja metala skladištena u SBA-15, indukuju senescenciju tumorskih ćelija. Međutim, ono što je ranije previđano, je da tradicionalne hemoterapije često indukuju potentan senescentni odgovor<sup>304–306</sup>. U brojnim studijama je pokazano da očekivani apoptotski odgovor nakon hemoterapije i terapije jonizujućim zračenjem upotpunjuje snažna istovremena indukcija senescencije<sup>307–311</sup>. Schmitt i saradnici su na mišjem modelu limfoma pokazali da hemoterapeutik ciklofosamid indukuje senescenciju posredovanu tumor supresorima p53 i p16<sup>INK4a</sup>, koja korelira sa boljom prognozom nakon hemoterapije u poređenju sa miševima koji imaju defekt u medijatorima senescencije<sup>311</sup>. Terapeutski pristup koji se zasniva na indukciji ćelijske senescencije predstavlja oblik ciljane terapije; deluje na specifične puteve koji indukuju ireverzibilan zastoj u rastu tumorske ćelije. Kao i kod ostalih vidova ciljane terapije, ne može se isključiti mogućnost povratnih mehanizama. S obzirom na ireverzibilnu prirodu ovog procesa, ostaje da se utvrdi relevantnost tih mehanizama<sup>305</sup>. Koncept senescencije u terapiji se pojavio u proteklih nekoliko godina kao novi pristup. Ipak, za razliku od

terapija baziranih na apoptozi, ideja o strategiji indukcije senescencije u cilju terapije kancera dočekana je sa skepticizmom zbog preovlađujuće dogme da imunski sistem ne uklanja senescentne ćelije, već ostaju deo tkiva. Danas se zna da je ćelijska senescencija fiziološki antitumorski odgovor kojim se tkivo suprotstavlja onkogenim promenama i predstavlja ne samo jednu od primarnih fizioloških mera inhibicije tumorigeneze, već je poznato da senescentne ćelije mogu da se uklone *in vivo*, putem urođenog imunskog odgovora<sup>305,312,313</sup>. Obilje podataka u literaturi ukazuje da je uloga ćelijske senescencije u zaustavljanju rasta tumora *in vivo* ranije potcenjivana, idući u prilog uvođenju *pro-senescentnog* pristupa u terapiju kancera. Ćelijska senescencija je primarni odgovor koji onemogućava progresiju tumora u ranim fazama tumorigeneze, ali, može da predstavlja antikancerski mehanizam i u kasnijim stupnjevima razvoja tumora<sup>305</sup>. Genetičke lezije koje iniciraju tumorigenezu, kao što je aktivacija Ras signalnog molekula ili gubitak tumor supresora PTEN, promovišu senescenciju u primarnim fazama tumorigeneze<sup>314</sup>. Nasuprot tome, već je pokazano da kod oformljenih tumora, kao što su mišji modeli MYC-zavisnih tumora, indukcija senescencije predstavlja esencijalnu komponentu regresije tumora nakon inaktivacije onkogenena. Naime, Wu i saradnici su pokazali da inaktivacija MYC onkogenena rezultuje u izrazitoj indukciji antitumorskih mehanizama, uključujući senescenciju. Autori su identifikovali ovaj proces kao specifični mehanizam suprostavljanja različitim tipovima tumora, uključujući osteosarkom, hepatocelularni karcinom i limfom<sup>315</sup>. Prevmene forme ćelijske senescencije nastaju bilo aktivacijom onkogenena (engl. *oncogene-induced senescence*, OIS)<sup>316</sup> ili gubitkom tumor supresorskih gena, *PTEN*, *VHL*, *NF1* i *Rb*<sup>306</sup>. Odgovor indukovan gubitkom tumor supresorskog gena *PTEN* (engl. *PTEN loss-induced cellular senescence*, PICS), predstavlja poseban oblik senescencije. Vrlo slično senescenciji indukovanoj onkogenima, p53 ima važnu ulogu u PICS. Međutim, u ovom kontekstu povećanje ekspresije p53 posreduje prekomerna aktivacija mTOR. Indukcija senescentnog odgovora ciljanim delovanjem na PTEN je provokativna hipoteza koja se pokazala uspešnom u modelima *in vitro* i *in vivo*. Na prvi pogled, delovanje na potentni tumor supresor izgleda donekle rizično, zbog mogućnosti aktivacije PI3K signalnog puta. Međutim, privremena i selektivna inaktivacija PTEN u tumorskoj ćeliji indukuje senescenciju prekomernom aktivacijom PI3K/Akt/mTOR/p53 signalnog puta<sup>305,317</sup>. Ovaj proces karakteriše permanentan zastoj u ćelijskom ciklusu, ipak, senescentne ćelije kontinuirano rastu. Ovaj paradoksalni fenomen ukazuje da su u



senescentnim ćelijama rast i proliferacija dva razdvojena procesa, regulisani različitim mehanizmima<sup>318</sup>. Izlaganje humanih fibroblasta vodonik peroksidu je model sistem za ispitivanje mehanizama indukcije senescencije<sup>319,320</sup>, s obzirom da vodonik peroksid stimuliše aktivnost PI3K, koja reguliše ćelijski rast aktivacijom nishodnih efektor<sup>321-323</sup>. Wang i saradnici su na istom model sistemu pokazali da aktivacija PI3K signalnog puta primarno reguliše ekspresiju senescentnog fenotipa humanih fibroblasta, uvećanje ćelija i ekspresiju SA- $\beta$ -Gal<sup>318</sup>.

Naši rezultati ukazuju da je inicijalna stimulacija PI3K signalnog puta najverovatnije odgovorna za indukciju senescentnog fenotipa B16 ćelija melanoma, nakon tretmana SBA-15pSn, dok je aktivacija melanogeneze posledica progresivne inhibicije ovog signalnog puta. Naime, poznato je da agensi koji povećavaju unutarćelijski nivo cAMP stimulišu sintezu melanina u ćelijama melanoma<sup>324,325</sup>, putem inhibicije PI3K signalnog puta<sup>239</sup>. Busca i saradnici su pokazali da je inhibicija PI3K i p70S6 kinaze uključena u regulaciju diferencijacije B16 ćelija melanoma. Autori su specifičnim inhibitorima ovih signalnih molekula stimulisali ekspresiju tirozinaze i dendritičnost ćelija melanoma, čime su imitirali efekat aktivacije cAMP signalnog puta na morfologiju B16 ćelija<sup>239</sup>. Veza između PI3K puta i melanogeneze je kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$  (engl. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* , GSK3 $\beta$ ). U B16 ćelijama, inhibicija fosforilacije Akt signalnog molekula, ključnog efektor<sup>326</sup> PI3K, aktivira GSK3 $\beta$  koja olakšava vezivanje MITF za promotor tirozinaze<sup>326</sup>. Iako mehanizmi u osnovi inhibicije proliferacije koji uključuju PI3K i p70S6 kinazu nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da je finalni fenotipski odgovor ćelije deterrninisan integracijom nishodnih signala<sup>238</sup>. U tom kontekstu, u nekoliko različitih studija je pokazano da aktivacija MEK/ERK signalnog puta stimuliše p38 MAP kinazu, koja zauzvrat indukuje akumulaciju inhibitora rasta i prevremenu senescenciju<sup>233,234,237,238</sup>. p38 $\alpha$  MAPK koordiniše odgovor na mnoge stresne stimulse uključujući reaktivne vrste kiseonika<sup>327</sup>. UV zračenje indukuje ekspresiju tirozinaze upravo putem p38 kinaze koja fosforiluje i aktivira USF-1, transkripcioni faktor koji se vezuje za promotor tirozinaze<sup>328</sup>. Za indukciju prevremene ćelijske senescencije ključna je interakcija Raf/MEK/ERK i MKK3/6-p38 signalnih puteva. Aktivacija MKK3/6 i p38 zahteva aktiviran ERK. Na osnovu toga, definisana je linearna putanja koja podrazumeva sekvencijalnu aktivaciju puteva koji posreduju onkogenom aktiviranu senescenciju u primarnih humanim fibroblastima<sup>237</sup>. ERK ne aktivira p38 direktnim

putem. Naime, Nicke i saradnici su pokazali da MINK kinaza posreduje stimulaciju p38 nishodno od Raf/MEK/ERK signalnog puta. Autori smatraju da ERK aktivira MINK mehanizmima koji uključuju reaktivne vrste kiseonika. MINK kinaza zatim pozitivno reguliše aktivnost p38 kinaze putem MKK3/6, što vodi ka permanentnom zastoju u ćelijskom ciklusu. Autori na kraju rezimiraju da je zastoj u ćelijskom ciklusu rezultat sekvencijalnog signalnog puta koji podrazumeva aktivaciju Raf/MEK/ERK kaskade, koja vodi ka ROS-posredovanoj aktivaciji MINK i p38 stres kinaza<sup>238</sup>. Aktivirana p38 MAPK reguliše ekspresiju gena, što rezultuje u akumulaciji p53 i prevremenoj ćelijskoj senescenciji<sup>237</sup>. Vrlo je moguće da pokazana produkcija ROS indukovana SBA-15pSn u B16 ćelijama, aktivira p38 koji posreduje prevremenu senescenciju ćelija melanoma. U prilog tome govori i činjenica da je inicijalna inhibicija ERK1/2 prolaznog karaktera; 48 h kada je zabeležen porast slobodnih radikala i maksimum aktivacije p38, ovaj signalni put je ponovo aktiviran. Nasuprot tome,  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  kontinuirano inhibira ERK i p38, što ukazuje da je inhibicija proliferacije, koja na kraju ne vodi ka senescentnim promenama ćelija melanoma, regulisana drugačijim signalima. Jedinjenje u slobodnoj formi indukuje zanemarljivu produkciju pigmenta u B16 ćelijama melanoma, pokrenutu inhibicijom PI3K/Akt signalnog puta, koja nije dovoljna za značajniju akumulaciju melanina u ovim ćelijama, što ukazuje da je p38 zapravo glavni regulator melanogeneze u B16 ćelijama, odnosno da integracija ova dva signalna puta odlučuje krajnji rezultat. Inhibicija proliferacije predstavlja konzerviranu funkciju p38 na različitim tipovima primarnih ćelija. Efekat p38 MAPK je posredovan negativnom regulacijom JNK (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)/c-Jun puta<sup>329,330</sup>. Hui i saradnici su na modelu kancera jetre pokazali da p38 zaustavlja proliferaciju ćelija suprimiranjem ovog puta, i da je JNK /c-Jun put ključna nishodna meta p38 tokom tumorigeneze<sup>329</sup>. Inaktivacija ovog signalnog puta u primarnim i tumorskim linijama razvija senescentni fenotip ćelija, dok je bazalna aktivnost JNK esencijalna za sprečavanje prevremene senescencije ćelija<sup>331,332</sup>. U ovoj studiji, rezultat integracije ushodnih signala je inhibicija JNK, koja se nalazi u osnovi citostatskog efekta eksperimentalnih jedinjenja. Dok je snažna inhibicija ovog signalnog puta, posredovana aktivacijom p38, usko povezana sa senescencijom ćelija melanoma pokrenutom SBA-15pSn, ushodni signali koji vode ka tome su očigledno drugačiji za  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ . Ćelijska senescencija može da se odvija paralelno sa apoptozom kao globalni odgovor ćelije na stres. Kako je p53 regulator oba procesa, nije poznato zašto

neke ćelije umiru, a druge stare<sup>311</sup>. Zna se da je senescencija indukovana lekovima najizraženija kada postoji apoptotski blok. To možda ukazuje da senescencija služi kao rezerva apoptozi, što je vrlo važno za ćelijske tipove koji prirodno nisu skloni apoptozi ili u kancerima koji su stekli rezistenciju na apoptozu tokom evolucije tumora<sup>311</sup>.

Transdiferencijacija senescentnih humanih ćelija melanoma u ćelije nalik Švanovim, pokazana u ovoj studiji, nagovestila je da SBA-15pSn možda utiče na signalne puteve koji regulišu rano razviće melanocita. Naime, rekapitulacija fenotipa Švanovih ćelija vrlo je karakteristična pojava za senescentne melanocite u nevusima. Ovi rani događaji diferencijacije predstavljaju tačku razmimoilaženja sa invazivnim ćelijama melanoma koje prate drugi put<sup>207</sup>. Očekivan rezultat u tom smislu je negativna regulacija *Notch* i *Wnt/β*-katenin puteva u A375 ćelijama melanoma, nakon tretmana eksperimentalnim agensima. Tkivnom organogenezom upravlja svega nekoliko evolutivno konzerviranih puteva, uključujući *Notch* i *Wnt* puteve<sup>333</sup>. Signalni put *Notch* receptora je konzerviran mehanizam ćelijske komunikacije, koji ima fundamentalnu ulogu u razviću metazoa. Iako je intracelularna transdukcija *Notch* signala jednostavna, bez sekundarnih glasnika, ovaj signalni put reguliše najrazličitije procese uključujući diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu u svim fazama morfogeneze<sup>334–336</sup>. Predstavlja glavni mehanizam regulacije homeostaze melanocita i ključnu komponentu ćelijskih interakcija između keratinocita i melanocita<sup>337–339</sup>. Melanomi nastaju primarno iz epidermalnih melanocita, tako da je logično da normalni i maligni melanociti dele ključne puteve koji regulišu homeostazu, uključujući invazivni i migratorni kapacitet, koji je centralan za ćelije melanocitne linije<sup>339</sup>. Povećan nivo *Notch 1* proteina je detektovan u lezijama humanog melanoma i ćelijskim linijama melanoma u poređenju sa nevusima i melanocitima<sup>340</sup>. Aktivacija *Notch* signalnog puta povezana je sa progresijom humanog melanoma. Onkogeni efekat ovog signalnog molekula na primarnim ćelijama melanoma je posredovan β-kateninom. Povećanje ekspresije β-katenina nakon aktivacije *Notch 1* signalnog puta, posreduje sticanje metastatskog potencijala RGP i VGP ćelija melanoma. *Notch* signalni put ne utiče na početne korake metastatske kaskade - lokalnu invaziju i intravazaciju tumorskih ćelija. Pretpostavlja se da reguliše posebne molekule ćelijske adhezije i migracije koji su neophodni za ekstravazaciju i rast ćelija melanoma na udaljenim mestima, na osnovu povećane ekspresije Mel-CAM (engl. *melanoma-associated cell adhesion molecule*) adhezivnog molekula<sup>340</sup>.

Jedan od najvažnijih signalnih puteva koji koordinišu promene u genskoj ekspresiji koje se odražavaju na ćelijsku adheziju i migraciju je *Wnt* signalni put<sup>341</sup>. Centralna figura ovog signalnog puta je  $\beta$ -katenin, transkripcioni kofaktor TCF/LEF faktora (engl. *T cell factor/lymphoid enhancer factor*), i adapterski protein u sastavu velikog proteinskog kompleksa ćelijske adhezije, koji povezuje kadherine sa snopom aktinskih filamenata. *Wnt* proteini predstavljaju važne regulatore proliferacije i diferencijacije ćelija nervne kreste. Najbolje okarakterisan signalni put *Wnt* proteina - *Wnt*/ $\beta$ -katenin (engl.  *$\beta$ -catenin-dependent Wnt signalling*) put - direktno učestvuje u koordinisanju promena u morfoloiji ćelija i signalima koji su neophodni za migraciju i invaziju<sup>341,342</sup>. Uloga  $\beta$ -katenina u progresiji melanoma je kompleksna. Promene u *Wnt*/ $\beta$ -katenin signalnom putu utiču na formiranje i progresiju melanoma *in vivo*. Akumulacija  $\beta$ -katenina u jedru, potencijalni indikator aktivacije *Wnt* signalnog puta, zabeležena je u približno jednoj trećini metastatskih melanoma. Konstitutivna aktivacija ovog proteina, zajedno sa inaktivacijom tumor supresora PTEN i prekomernom ekspresijom <sup>V600E</sup>BRAF, podstiče metastatsku progresiju u mišjem modelu melanoma. *Wnt* signalni put posreduje u kompleksnim ćelijskim interakcijama koje su neophodne za metastatsku progresiju, na osnovu čega je označen kao regulator metastaza u melanomu<sup>46,343</sup>. Ovde pokazana negativna regulacija  $\beta$ -katenin i *Notch 1* signalnih molekula, ukazuje da morfološke promene A375 ćelija indukovane SBA-15pSn, koreliraju sa smanjenim metastatskim potencijalom ćelija melanoma. Definitivni pokazatelj diferencijacije senescentnih ćelija melanoma je gubitak ekspresije Okt-3/4 regulatora pluripotencije, nakon tretmana SBA-15pSn, što je povezano sa transdiferencijacijom A375 ćelija. Direktno reprogramiranje diferenciranih ćelija u indukovane pluripotentne matične ćelije (engl. *iPSCs*), postiže se prekomernom ekspresijom Okt-3/4 transkripcionog faktora<sup>344,345</sup>. *POU homeobox* protein Okt-3/4 (POU5F1) je ključan za formiranje populacije pluripotentnih matičnih ćelija u embrionu sisara. Precizan nivo ovog proteina određuje razvojni put embrionskih matičnih ćelija<sup>346</sup>. Smatra se da je u osnovi heterogenosti melanoma zapravo postojanje subpopulacije sa plastičnošću ćelija nervne kreste, zahvaljujući ekspresiji regulatora pluripotencije<sup>347,348</sup>. Migratorne i invazivne osobine agresivnih ćelija melanoma mogu da se održe zahvaljujući postojanju ćelija u kojima su reaktivirani elementi molekularne mreže odgovorne za specifično migratorno ponašanje nervne kreste<sup>349</sup>. Pokazano je da prekomerna ekspresija Okt-3/4 markera pluripotencije povećava migratorni kapacitet

A375 ćelija kroz indukciju ekspresije gena koji su uključeni u prelaz iz mezenhimalnog u ameboidni fenotip pokretljivosti (engl. *mesenchymal-to-amoeboid transition*, MAT). Ekspresija ovih gena je u korelaciji sa agresivnim fenotipom ćelija kancera, što sugerira da je ameboidna pokretljivost karakteristika invazivnih ćelija<sup>350</sup>. Redukcija ameboidne pokretljivosti i sticanje izdužene morfologije umanjuje sposobnost tumorskih ćelija za metastatsku kolonizaciju, što označava da je ameboidno ponašanje ćelija efikasnije u uspostavljanju metastaza<sup>251,351</sup>. Posmatranje i analiza morfologije ćelija, kao i prisustvo karakterističnih ćelijskih nastavaka, predstavljaju koristan način za praćenje ćelijske pokretljivosti<sup>352</sup>. Naši rezultati pokazuju da je SBA-15pSn indukovao izrazito izduženu ili mezenhimalnu morfologiju A375 ćelija, koja zavisi od polimerizacije aktina<sup>353</sup>. A375 ćelije ne uspostavljaju međućelijske kontakte, što je ključno za migratorno ponašanje ovih ćelija. Cisplatina, sa druge strane, ne utiče na komunikaciju A375 ćelija. Iako je brojnost kulture smanjena nakon tretmana cisplatinom, preostale ćelije se grupišu, što omogućava njihov opstanak. Ćelije melanoma karakteriše lančani tip migracije, gde klasteri ćelija formiraju lance koje započinje prva invadirajuća ili *gerilska* ćelija. Dok se kreću, formiraju međućelijske kontakte (engl. *tip-like junctions*), tako da su mehanizmi komunikacije očuvani. Ovaj tip organizacije tumorskih ćelija koje migriraju, predstavlja vrlo efikasan mehanizam penetracije, karakterističan za visok metastatski potencijal<sup>352</sup>. U mehanizmu delovanja leka redukcija migratornog ponašanja podjednako je važna kao i smanjenje rasta tumorskih ćelija, što podrazumeva kombinovane režime ili lekove koji ispoljavaju delovanje na oba aspekta malignog fenotipa.

U celini, rezultati ove studije pokazuju da inkapsulacija  $\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  u mezoporozni nanomaterijal SBA-15, suštinski menja antitumorsko delovanje citotoksičnog agensa. Nanomaterijal formira veštački matriks koji ukotvljava ćelije kancera i pokreće signale, čijom integracijom se postiže odgovor kompatibilan sa prirodnim procesom uklanjanja izmenjenih ćelija.

## 6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima studije i na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1.  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  i SBA-15pSn smanjuju vijabilitet ćelijskih linija melanoma B16 poreklom od miša i A375 poreklom od čoveka *in vitro*.
2.  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  i SBA-15pSn inhibiraju rast ćelija mišjeg melanoma *in vivo*.
3. A375 ćelije preuzimaju SBA-15pSn pasivnim putem i makropinocitozom.
4.  $[\text{Ph}_3\text{Sn}(\text{CH}_2)_6\text{OH}]$  indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza u obe ćelijske linije melanoma i inhibira proliferaciju preživelih klonova, koji se nalaze u stanju mirovanja.
5. SBA-15pSn indukuje apoptozu i prevremenu senescenciju B16 ćelija melanoma, praćenu ekspresijom markera diferencijacije, koja je povezana sa promenama u aktivnosti PI3K/Akt i MAPK signalnog puta.
6. SBA-15pSn indukuje prevremenu senescenciju humanih ćelija melanoma; određeni procenat senescentnih ćelija ispoljava osobine terminalno diferentovanih melanocita koje karakteriše fenotip ćelija nalik Švanovim.
7. Morfološka transformacija A375 ćelija melanoma pokrenuta SBA-15pSn, korelira sa inhibicijom signalnih puteva koji regulišu migraciju i održavanje pluripotentnog, niskodiferentovanog fenotipa ćelija melanoma.

## 7. LITERATURA



1. Kawakami A, Fisher DE. Key discoveries in melanocyte development. *J Invest Dermatol.* 2011;131(E1):E2–4.
2. Hearing VJ. Milestones in melanocytes/melanogenesis. *J Invest Dermatol.* 2011;131(E1):E1.
3. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007;445(7130):843–50.
4. Raposo G, Marks MS. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):786–97.
5. Mason HS. The chemistry of melanin; mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J Biol Chem.* 1948;172(1):83–99.
6. Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol.* 2011;131(E1):E8–11.
7. Körner A, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science.* 1982;217(4565):1163–5.
8. Marks MS, Seabra MC. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(10):738–48.
9. Fitzpatrick TB, Breathnach AS. The epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr.* 1963;147:481–9.
10. Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Szabo G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol.* 1976;67(1):72–89.
11. Fitzpatrick TB, Szabo G. The melanocyte: cytology and cytochemistry. *J Invest Dermatol.* 1959;32(2, Part 2):197–209.
12. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2005;10(2):153–63.
13. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):46–54.
14. Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:551–79.
15. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:239–71.
16. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Skin Tumours.* Lyon: IARC Press; 2006. p. 50.

17. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol*. 1986;17(5):443–50.
18. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355(1):51–65.
19. MacKie RM. Risk factors for the development of primary cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin*. 2002;20(4):597–600.
20. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25(6):459–63.
21. Naysmith L, Waterston K, Ha T, Flanagan N, Bisset Y, Ray A, Wakamatsu K, Ito S, Rees JL. Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):423–8.
22. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*. 1995;11(3):328–30.
23. Frändberg PA, Doufexis M, Kapas S, Chhájilani V. Human pigmentation phenotype: a point mutation generates nonfunctional MSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;245(2):490–2.
24. Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, Willemze R, Bavinck JN. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol*. 2001;117(2):294–300.
25. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984;15(12):1147–65.
26. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007;445(7130):851–7.
27. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res*. 2006;66(6):2881–4.
28. Lynch HT, Fusaro RM, Kimberling WJ, Lynch JF, Danes BS. Familial atypical multiple mole-melanoma (FAMMM) syndrome: segregation analysis. *J Med Genet*. 1983;20(5):342–4.
29. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(11):875–85.
30. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res*. 2002;8(12):3728–33.

31. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 2003;63(4):756–9.
32. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol.* 2005;36(5):486–93.
33. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949–54.
34. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003;33(1):19–20.
35. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006;441(7092):424–30.
36. Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2006;16(2):197–200.
37. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003;22(20):3113–22.
38. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7002–10.
39. Smalley KSM, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(5):1136–44.
40. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell.* 1993;74(2):395–404.
41. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med.* 2006;12(9):406–14.

42. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*. 2003;22(20):3035–41.
43. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol*. 2005;170(5):703–8.
44. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005;436(7047):117–22.
45. Takeda K, Yasumoto K, Takada R, Takada S, Watanabe K, Udono T, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14013–6.
46. Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1999;154(2):325–9.
47. Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene*. 2003;22(20):3063–9.
48. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
49. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704–7.
50. Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene*. 2003;22(20):3053–62.
51. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3092–8.
52. Polsky D, Young AZ, Busam KJ, Alani RM. The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas. *Cancer Res*. 2001;61(16):6008–11.
53. Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, Marais R, Wynford-Thomas D, Bennett DC. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*. 2006;95(4):496–505.
54. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CMAM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 2005;436(7051):720–4.

55. Papp T, Pemsel H, Rollwitz I, Schipper H, Weiss DG, Schiffmann D, Zimmermann R. Mutational analysis of N-ras, p53, CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDK4, and MC1R genes in human dysplastic melanocytic naevi. *J Med Genet.* 2003;40(2):E14.
56. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):345–57.
57. Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrist BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci.* 1994;107:983–92.
58. Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene.* 2001;20(56):8125–35.
59. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1996;1(2):188–94.
60. Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, Bruton R, Marsden JR, Jankowski J. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol.* 1999;52(3):151–7.
61. Qi J, Chen N, Wang J, Siu C-H. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):4386–97.
62. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 2001;61(9):3819–25.
63. Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 1996;85(5):683–93.
64. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol.* 2000;115(4):625–32.
65. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):237–51.
66. Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer.* 2007;109(3):455–64.

67. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006;20(16):2149–82.
68. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin.* 2000;50(4):215–36.
69. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer.* 1989;64(10):2024–9.
70. Del Prete SA, Maurer LH, O'Donnell J, Forcier RJ, LeMarbre P. Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine, and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat Rep.* 1984;68(11):1403–5.
71. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2745–51.
72. Gajewski TF, Salama AKS, Niedzwiecki D, Johnson J, Linette G, Bucher C, Blaskovich MA, Sebt SM, Haluska F. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in advanced melanoma (CALGB 500104). *J Transl Med.* 2012;10(246):1–8.
73. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, Hirth P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(11):873–86.
74. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099–109.
75. Flaherty KT, Schiller J, Schuchter LM, Liu G, Tuveson DA, Redlinger M, Lathia C, Xia C, Petrenciuc O, Hingorani SR, Jacobetz MA, Van Belle PA, Elder D, Brose MS, Weber BL, Albertini MR, O'Dwyer PJ. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 2008;14(15):4836–42.
76. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, Eggermont A, Grabbe S, Gonzalez R, Gille J, Peschel C, Schadendorf D, Garbe C, O'Day S, Daud A, White JM, Xia C, Patel K, Kirkwood JM, Keilholz U. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with

carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(17):2823–30.

77. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KYJ, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature.* 2010;467(7315):596–9.
78. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507–16.
79. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809–19.
80. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012;366(8):707–14.
81. Hauschild A, Grob J-J, Demidov L V, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martín A-M, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;380(9839):358–65.
82. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov L V, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JMG, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martín A-M, Patel K, Schadendorf D. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2012;367(2):107–14.
83. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee M-K, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010;468(7326):973–7.

84. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee M-K, Lee H, Koya RC, Ng C, Chodon T, Scolyer RA, Dahlman KB, Sosman JA, Kefford RF, Long G V, Nelson SF, Ribas A, Lo RS. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2012;3:724.
85. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherland DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012;487(7408):505–9.
86. Gibney GT, Messina JL, Fedorenko I V, Sondak VK, Smalley KSM. Paradoxical oncogenesis--the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(7):390–9.
87. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJC, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010;464(7287):431–5.
88. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell.* 2010;140(2):209–21.
89. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature.* 2010;464(7287):427–30.
90. Dalle S, Poulalhon N, Thomas L. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;365(15):1448–9.
91. Su F, Viros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, Reis-Filho JS, Kong X, Koya RC, Flaherty KT, Chapman PB, Kim MJ, Hayward R, Martin M, Yang H, Wang Q, Hilton H, Hang JS, Noe J, Lambros M, Geyer F, Dhomen N, Niculescu-Duvaz I, Zamboni A, Niculescu-Duvaz D, Preece N, Robert L, Otte NJ, Mok S, Kee D, Ma Y, Zhang C, Habets G, Burton EA, Wong B, Nguyen H, Kockx M, Andries L, Lestini B, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Troy JL, Gonzalez R, Hutson TE, Puzanov I, Chmielowski B, Springer CJ, McArthur GA, Sosman JA, Lo RS, Ribas A, Marais R. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med.* 2012;366(3):207–15.
92. Zimmer L, Hillen U, Livingstone E, Lacouture ME, Busam K, Carvajal RD, Egberts F, Hauschild A, Kashani-Sabet M, Goldinger SM, Dummer R, Long G V, McArthur G, Scherag A, Sucker A, Schadendorf D. Atypical melanocytic



- proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. *J Clin Oncol.* 2012;30(19):2375–83.
93. Anforth R, Fernandez-Peñas P, Long G V. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol.* 2013;14(1):e11–8.
  94. Callahan MK, Rampal R, Harding JJ, Klimek VM, Chung YR, Merghoub T, Wolchok JD, Solit DB, Rosen N, Abdel-Wahab O, Levine RL, Chapman PB. Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment. *N Engl J Med.* 2012;367(24):2316–21.
  95. Girotti MR, Lopes F, Preece N, Niculescu-Duvaz D, Zambon A, Davies L, Whittaker S, Saturno G, Viros A, Pedersen M, Suijkerbuijk BMJM, Menard D, McLeary R, Johnson L, Fish L, Ejima S, Sanchez-Laorden B, Hohloch J, Carragher N, Macleod K, Ashton G, Marusiak AA, Fusi A, Brognard J, Frame M, Lorigan P, Marais R, Springer C. Paradox-Breaking RAF Inhibitors that Also Target SRC Are Effective in Drug-Resistant BRAF Mutant Melanoma. *Cancer Cell.* 2015;27(1):85–96.
  96. Le K, Blomain ES, Rodeck U, Aplin AE. Selective RAF inhibitor impairs ERK1/2 phosphorylation and growth in mutant NRAS, vemurafenib-resistant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(4):509–17.
  97. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N, Kudchadkar R, Burris HA, Falchook G, Algazi A, Lewis K, Long G V, Puzanov I, Lebowitz P, Singh A, Little S, Sun P, Allred A, Ouellet D, Kim KB, Patel K, Weber J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 2012;367(18):1694–703.
  98. Long G V., Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Sileni VC, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JBAG, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probachai V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin A-M, Le N, Patel K, Flaherty K. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1877–88.
  99. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, Hauschild A, Lorigan P, Wolter P, Long G V., Flaherty K, Nathan P, Ribas A, Martin A-M, Sun P, Crist W, Legos J, Rubin SD, Little SM, Schadendorf D. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med.* 2015;372(1):30–9.
  100. Webster RM, Mentzer SE. The malignant melanoma landscape. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(7):491–2.

101. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006;439(7074):358–62.
102. Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):349–61.
103. Davies MA, Fox PS, Papadopoulos NE, Bedikian AY, Hwu W-J, Lazar AJ, Prieto VG, Culotta KS, Madden TL, Xu Q, Huang S, Deng W, Ng CS, Gupta S, Liu W, Dancey JE, Wright JJ, Bassett RL, Hwu P, Kim KB. Phase I study of the combination of sorafenib and temsirolimus in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):1120–8.
104. Margolin K, Longmate J, Baratta T, Synold T, Christensen S, Weber J, Gajewski T, Quirt I, Doroshow JH. CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium. *Cancer*. 2005;104(5):1045–8.
105. Margolin KA, Moon J, Flaherty LE, Lao CD, Akerley WL, Othus M, Sosman JA, Kirkwood JM, Sondak VK. Randomized phase II trial of sorafenib with temsirolimus or tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):1129–37.
106. Algazi AP, Cha E, Ortiz-Urda SM, McCalmont T, Bastian BC, Hwang J, Pampaloni MH, Behr S, Chong K, Cortez B, Quiroz A, Coakley F, Liu S, Daud AI. The combination of axitinib followed by paclitaxel/carboplatin yields extended survival in advanced BRAF wild-type melanoma: results of a clinical/correlative prospective phase II clinical trial. *Br J Cancer*. 2015;112(8):1326–31.
107. Fruehauf J, Lutzky J, McDermott D, Brown CK, Meric J-B, Rosbrook B, Shalinsky DR, Liau KF, Niethammer AG, Kim S, Rixe O. Multicenter, phase II study of axitinib, a selective second-generation inhibitor of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(23):7462–9.
108. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresch DA. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha v\beta 3$ . *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):3056–61.
109. Kim KB, Eton O, Davis DW, Frazier ML, McConkey DJ, Diwan AH, Papadopoulos NE, Bedikian AY, Camacho LH, Ross MI, Cormier JN, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF, Billings LA, Ng CS, Charnsangavej C, Bar-Eli M, Johnson MM, Murgu AJ, Prieto VG. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2008;99(5):734–40.
110. Wyman K, Atkins MB, Prieto V, Eton O, McDermott DF, Hubbard F, Byrnes C, Sanders K, Sosman JA. Multicenter Phase II trial of high-dose imatinib mesylate

- in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer*. 2006;106(9):2005–11.
111. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman R-A, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick AC, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian BC, Schwartz GK. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 2011;305(22):2327–34.
  112. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;77(7):1303–10.
  113. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*. 1996;14(1):7–17.
  114. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol*. 1999;17(7):2105–16.
  115. Phan GQ, Attia P, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(15):3477–82.
  116. Atkins MB, O’Boyle KR, Sosman JA, Weiss GR, Margolin KA, Ernest ML, Kappler K, Mier JW, Sparano JA, Fisher RI. Multiinstitutional phase II trial of intensive combination chemoimmunotherapy for metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1994;12(8):1553–60.
  117. Richards JM, Mehta N, Ramming K, Skosey P. Sequential chemoimmunotherapy in the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1992;10(8):1338–43.
  118. Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C, Ring SE, Papadopoulos NE, Plager C, East MJ, Zhan F, Benjamin RS. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2002;20(8):2045–52.
  119. Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, Papadopoulos N. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1998;16(5):1752–9.
  120. Stevanovic S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):514–20.

121. Parmiani G, Castelli C, Rivoltini L, Casati C, Tully GA, Novellino L, Patuzzo A, Tosi D, Anichini A, Santinami M. Immunotherapy of melanoma. *Semin Cancer Biol.* 2003;13(6):391–400.
122. Delamarre L, Mellman I, Yadav M. Cancer immunotherapy. Neo approaches to cancer vaccines. *Science.* 2015;348(6236):760–1.
123. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EME, Schotte R, Calis JJA, Behjati S, Velds A, Hilkmann H, Atmioui D El, Visser M, Stratton MR, Haanen JBAG, Spits H, van der Burg SH, Schumacher TNM. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med.* 2015;21(1):81–5.
124. Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, Petti AA, Ly A, Lie W-R, Hildebrand WH, Mardis ER, Linette GP. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science.* 2015;348(6236):803–8.
125. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711–23.
126. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64.
127. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, Waterfield W, Schadendorf D, Smylie M, Guthrie T, Grob J-J, Chesney J, Chin K, Chen K, Hoos A, O’Day SJ, Lebbé C. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):155–64.
128. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warzocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *N Engl J Med.* 2015;372(4):320–30.
129. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, Weber JS, Joshua AM, Hwu W-J, Gangadhar TC, Patnaik A, Dronca R, Zarour H, Joseph RW, Boasberg P, Chmielowski B, Mateus C, Postow MA, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Li XN, Iannone R, Ebbinghaus SW, Kang SP, Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet.* 2014;384(9948):1109–17.

130. Rakhra K, Bachireddy P, Zabuawala T, Zeiser R, Xu L, Kopelman A, Fan AC, Yang Q, Braunstein L, Crosby E, Ryeom S, Felsher DW. CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer Cell*. 2010;18(5):485–98.
131. Mjos KD, Orvig C. Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev*. 2014;114(8):4540–63.
132. Ehrlich P. Die Behandlung der Syphilis mit dem Ehrlichschen Präparat 606. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 1910;1893–6.
133. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(6):473–80.
134. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969;222(5191):385–6.
135. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205(4972):698–9.
136. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):573–84.
137. Collery P, Domingo JL, Keppler BK. Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III). *Anticancer Res*. 1996;16(2):687–91.
138. Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson PJ, Keppler BK. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers*. 2008;5(10):2140–55.
139. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK. From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem*. 2006;100(5-6):891–904.
140. Bergamo A, Gava B, Alessio E, Mestroni G, Serli B, Cocchietto M, Zorzet S, Sava G. Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity. *Int J Oncol*. 2002;21(6):1331–8.
141. Sava G, Zorzet S, Turrin C, Vita F, Soranzo M, Zabucchi G, Cocchietto M, Bergamo A, DiGiovine S, Pezzoni G, Sartor L, Garbisa S. Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin Cancer Res*. 2003;9(5):1898–905.

142. Van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today*. 2009;14(23-24):1089–97.
143. Navakoski de Oliveira K, Andermark V, Onambele LA, Dahl G, Prokop A, Ott I. Organotin complexes containing carboxylate ligands with maleimide and naphthalimide derived partial structures: TrxR inhibition, cytotoxicity and activity in resistant cancer cells. *Eur J Med Chem*. 2014;87:794–800.
144. Navakoski de Oliveira K, Andermark V, von Grafenstein S, Onambele LA, Dahl G, Rubbiani R, Wolber G, Gabbiani C, Messori L, Prokop A, Ott I. Butyltin(IV) benzoates: inhibition of thioredoxin reductase, tumor cell growth inhibition, and interactions with proteins. *ChemMedChem*. 2013;8(2):256–64.
145. Romero-Canelón I, Sadler PJ. Next-generation metal anticancer complexes: multitargeting via redox modulation. *Inorg Chem*. 2013;52(21):12276–91.
146. Alama A, Tasso B, Novelli F, Sparatore F. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents. *Drug Discov Today*. 2009;14(9-10):500–8.
147. Hadjikakou S, Hadjiliadis N. Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. *Coord Chem Rev*. 2009;253(1-2):235–49.
148. Crowe AJ. Antitumour activity of tin compounds. In: Fricker SP, editor. *Metal Compounds in Cancer Therapy*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1994. p. 147–79.
149. Sasada T, Iwata S, Sato N, Kitaoka Y, Hirota K, Nakamura K, Nishiyama A, Taniguchi Y, Takabayashi A, Yodoi J. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest*. 1996;97(10):2268–76.
150. Burke-Gaffney A, Callister MEJ, Nakamura H. Thioredoxin: friend or foe in human disease? *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(8):398–404.
151. Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxin system--from science to clinic. *Med Res Rev*. 2004;24(1):40–89.
152. Barnard PJ, Berners-Price SJ. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord Chem Rev*. 2007;251(13-14):1889–902.
153. Schallreuter KU, Wood JM. New aspects in the pathophysiology of cutaneous melanoma: a review of the role of thioproteins and the effect of nitrosoureas. *Melanoma Res*. 1991;1(3):159–67.

154. Soderberg A, Sahaf B, Rosen A. Thioredoxin Reductase, a Redox-active Selenoprotein, Is Secreted by Normal and Neoplastic Cells: Presence in Human Plasma. *Cancer Res.* 2000;60(8):2281–9.
155. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR. Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999;99(9):2511–34.
156. Collins I, Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2006;2(12):689–700.
157. Devadasu VR, Bhardwaj V, Kumar MNVR. Can controversial nanotechnology promise drug delivery? *Chem Rev.* 2013;113(3):1686–735.
158. Kreuter J. Nanoparticles. In: Swarbrick J, Boylan JC, editors. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker; 1994. p. 165–90.
159. Rosenholm JM, Sahlgren C, Lindén M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles—opportunities & challenges. *Nanoscale.* 2010;2(10):1870–83.
160. Mamaeva V, Sahlgren C, Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(5):689–702.
161. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12):6387–92.
162. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751–60.
163. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* 2004;303(5665):1818–22.
164. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):771–82.
165. Kircher MF, Mahmood U, King RS, Weissleder R, Josephson L. A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. *Cancer Res.* 2003;63(23):8122–5.
166. Nam J-M, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc.* 2004;126(19):5932–3.
167. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):161–71.
168. Barry NPE, Sadler PJ. Challenges for metals in medicine: how nanotechnology may help to shape the future. *ACS Nano.* 2013;7(7):5654–9.

169. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu C-W, Lin VS-Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1278–88.
170. Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv Mater.* 2012;24(12):1504–34.
171. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson G, Chmelka B, Stucky G. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science.* 1998;279(5350):548–52.
172. Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007;46(40):7548–58.
173. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):48–58.
174. Ashley CE, Carnes EC, Phillips GK, Padilla D, Durfee PN, Brown PA, Hanna TN, Liu J, Phillips B, Carter MB, Carroll NJ, Jiang X, Dunphy DR, Willman CL, Petsev DN, Evans DG, Parikh AN, Chackerian B, Wharton W, Peabody DS, Brinker CJ. The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nat Mater.* 2011;10(5):389–97.
175. Chen AM, Zhang M, Wei D, Stueber D, Taratula O, Minko T, He H. Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells. *Small.* 2009;5(23):2673–7.
176. Meng H, Liong M, Xia T, Li Z, Ji Z, Zink JJ, Nel AE. Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and P-glycoprotein siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. *ACS Nano.* 2010;4(8):4539–50.
177. Lu J, Liong M, Zink JJ, Tamanoi F. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small.* 2007;3(8):1341–6.
178. Guerrero-Martínez A, Pérez-Juste J, Liz-Marzán LM. Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials. *Adv Mater.* 2010;22(11):1182–95.
179. Irvine DJ. Drug delivery: One nanoparticle, one kill. *Nat Mater.* 2011;10(5):342–3.
180. Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, DeStanchina E, Longo V, Herz E, Iyer S, Wolchok J, Larson SM, Wiesner U, Bradbury MS. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2768–80.



181. Pérez-Quintanilla D, Gómez-Ruiz S, Zizak Z, Sierra I, Prashar S, del Hierro I, Fajardo M, Juranić ZD, Kaluderović GN. A new generation of anticancer drugs: mesoporous materials modified with titanocene complexes. *Chemistry*. 2009;15(22):5588–97.
182. Kaluderović GN, Kommera H, Hey-Hawkins E, Paschke R, Gómez-Ruiz S. Synthesis and biological applications of ionic triphenyltin(IV) chloride carboxylate complexes with exceptionally high cytotoxicity. *Metallomics*. 2010;2(6):419–28.
183. Gómez-Ruiz S, Kaluderović GN, Prashar S, Hey-Hawkins E, Erić A, Zizak Z, Juranić ZD. Study of the cytotoxic activity of di and triphenyltin(IV) carboxylate complexes. *J Inorg Biochem*. 2008;102(12):2087–96.
184. Bulatović MZ, Maksimović-Ivanić D, Bensing C, Gómez-Ruiz S, Steinborn D, Schmidt H, Mojić M, Korać A, Golić I, Pérez-Quintanilla D, Momčilović M, Mijatović S, Kaluderović GN. Organotin(IV)-loaded mesoporous silica as a biocompatible strategy in cancer treatment. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014;53(23):5982–7.
185. Herlyn M, Fukunaga-Kalabis M. What is a good model for melanoma? *J Invest Dermatol*. 2010;130(4):911–2.
186. Melnikova VO, Bolshakov S V, Walker C, Ananthaswamy HN. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene*. 2004;23(13):2347–56.
187. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973;51(5):1417–23.
188. Kozlowski JM, Hart IR, Fidler IJ, Hanna N. A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1984;72(4):913–7.
189. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*. 2000;406(6795):532–5.
190. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 2012;483(7387):100–3.
191. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.

192. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55–63.
193. Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*. 1984;68(1-2):167–75.
194. Loken MR, Herzenberg LA. Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann N Y Acad Sci*. 1975;254:163–71.
195. Bulatović M, Kaluđerović MR, Mojić M, Zmejkovski BB, Hey-Hawkins E, Vidaković M, Grdović N, Kaluđerović GN, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D. Improved in vitro antitumor potential of (O,O'-Diisobutyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propionate)tetrachloridoplatinum(IV) complex under normoxic and hypoxic conditions. *Eur J Pharmacol*. 2015;760:136–44.
196. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;171(1):131–7.
197. Quah BJC, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2049–56.
198. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39–51.
199. Bejarano E, Yuste A, Patel B, Stout RF, Spray DC, Cuervo AM. Connexins modulate autophagosome biogenesis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(5):401–14.
200. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(6):1889–92.
201. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1997;243(1-2):240–6.
202. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999;38(21):3209–12.
203. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*. 1988;75(7):354–5.

204. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798–806.
205. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363–7.
206. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell.* 1999;96(5):737–49.
207. Reed JA, Finnerty B, Albino AP. Divergent cellular differentiation pathways during the invasive stage of cutaneous malignant melanoma progression. *Am J Pathol.* 1999;155(2):549–55.
208. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
209. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
210. Friedmann PS, Gilchrist BA. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J Cell Physiol.* 1987;133(1):88–94.
211. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(8):603–12.
212. Faklaris O, Joshi V, Irinopoulou T, Tauc P, Sennour M, Girard H, Gesset C, Arnault J-C, Thorel A, Boudou J-P, Curmi PA, Treussart F. Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells. *ACS Nano.* 2009;3(12):3955–62.
213. Heuser JE, Anderson RG. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol.* 1989;108(2):389–400.
214. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 1992;68(4):673–82.
215. García-Peñas A, Gómez-Ruiz S, Pérez-Quintanilla D, Paschke R, Sierra I, Prashar S, del Hierro I, Kaluđerović GN. Study of the cytotoxicity and particle action in human cancer cells of titanocene-functionalized materials with potential application against tumors. *J Inorg Biochem.* 2012;106(1):100–10.

216. Kaluderović GN, Pérez-Quintanilla D, Zizak Z, Juranić ZD, Gómez-Ruiz S. Improvement of cytotoxicity of titanocene-functionalized mesoporous materials by the increase of the titanium content. *Dalton Trans.* 2010;39(10):2597–608.
217. Kaluderović GN, Pérez-Quintanilla D, Sierra I, Prashar S, Hierro I del, Žižak Ž, Juranić ZD, Fajardo M, Gómez-Ruiz S. Study of the influence of the metal complex on the cytotoxic activity of titanocene-functionalized mesoporous materials. *J Mater Chem.* 2010;20(4):806–14.
218. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials.* 2010;31(3):438–48.
219. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002;108(2):153–64.
220. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005;115(10):2679–88.
221. Radovic J, Maksimovic-Ivanic D, Timotijevic G, Popadic S, Ramic Z, Trajkovic V, Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Mijatovic S. Cell-type dependent response of melanoma cells to aloe emodin. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(9):3181–9.
222. Mijatovic SA, Timotijevic GS, Miljkovic DM, Radovic JM, Maksimovic-Ivanic DD, Dekanski DP, Stosic-Grujicic SD. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *Int J Cancer.* 2011;128(8):1955–65.
223. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D, Harhaji L, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(5):589–98.
224. Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Miljkovic D, Harhaji-Trajkovic L, Timotijevic G, Mojic M, Dabideen D, Cheng KF, McCubrey JA, Mangano K, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1169–78.
225. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010;24(22):2463–79.
226. Bandyopadhyay D, Medrano EE. Melanin accumulation accelerates melanocyte senescence by a mechanism involving p16INK4a/CDK4/pRB and E2F1. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908(1):71–84.
227. Sviderskaya E V, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, Cheong SC, Beach D, DePinho RA, Bennett DC. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(6):446–54.

228. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*. 2008;314(9):1918–22.
229. Meierjohann S. Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. *Eur J Cell Biol*. 2014;93(1-2):36–41.
230. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579–91.
231. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7936–40.
232. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, Nakayama K, Nakayama KI, Ide T, Saya H, Hara E. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11):1291–7.
233. Bulavin D V, Kovalsky O, Hollander MC, Fornace AJ. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Mol Cell Biol*. 2003;23(11):3859–71.
234. Deng Q, Liao R, Wu B-L, Sun P. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279(2):1050–9.
235. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*. 1998;12(19):3008–19.
236. Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R, Xie C, Chen J, Deng Q, Yamout M, Dong M-Q, Frangou CG, Yates JR, Wright PE, Han J. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*. 2007;128(2):295–308.
237. Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, Sun P. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*. 2002;22(10):3389–403.
238. Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, Warne PH, Cowling V, Cook SJ, Peters G, Delpuech O, Schulze A, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Ganesan TS, Downward J, Hancock DC. Involvement of MINK, a Ste20 Family Kinase, in Ras Oncogene-Induced Growth Arrest in Human Ovarian Surface Epithelial Cells. *Mol Cell*. 2005;20(5):673–85.

239. Buscà R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem.* 1996;271(50):31824–30.
240. Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science.* 2002;298(5596):1245–8.
241. Keilhoff G, Goihl A, Langnäse K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(1):11–24.
242. Massi D, Franchi A, Sardi I, Magnelli L, Paglierani M, Borgognoni L, Maria Reali U, Santucci M. Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. *J Pathol.* 2001;194(2):194–200.
243. Massi D, De Nisi MC, Franchi A, Mourmouras V, Baroni G, Panelos J, Santucci M, Miracco C. Inducible nitric oxide synthase expression in melanoma: implications in lymphangiogenesis. *Mod Pathol.* 2009;22(1):21–30.
244. Salvucci O, Carsana M, Bersani I, Tragni G, Anichini A. Antiapoptotic Role of Endogenous Nitric Oxide in Human Melanoma Cells. *Cancer Res.* 2001;61(1):318–26.
245. Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry.* 2000;39(5):1040–7.
246. Benhar M, Forrester MT, Stamler JS. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):721–32.
247. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer.* 2014;14(11):709–21.
248. Stamler JS, Hausladen A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol.* 1998;5(4):247–9.
249. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res.* 2013;73(13):4112–22.
250. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 2008;135(3):510–23.
251. Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol.* 2008;10(2):127–37.
252. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009;136(5):823–37.

253. Steeg PS, Theodorescu D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008;5(4):206–19.
254. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003;3(6):537–49.
255. Hynes RO. Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell.* 2003;113(7):821–3.
256. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):563–72.
257. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):737–49.
258. Li W, Melton DW. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2012. p. 2412–22.
259. Shahzad MMK, Lopez-Berestein G, Sood AK. Novel strategies for reversing platinum resistance. *Drug Resist Updat.* 2009;12(6):148–52.
260. Niu L, Li Y, Li Q. Medicinal properties of organotin compounds and their limitations caused by toxicity. *Inorganica Chim Acta.* 2014;423:2–13.
261. Arjmand F, Parveen S, Tabassum S, Pettinari C. Organo-tin antitumor compounds: Their present status in drug development and future perspectives. *Inorganica Chim Acta.* 2014;423:26–37.
262. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(10):750–63.
263. Juliano R. Nanomedicine: is the wave cresting? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(3):171–2.
264. Cheng CJ, Tietjen GT, Saucier-Sawyer JK, Saltzman WM. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(4):239–47.
265. Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Bombelli FB, Hristov DR, Kelly PM, Åberg C, Mahon E, Dawson KA. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol.* 2013;8(2):137–43.
266. Cheng Z, Al Zaki A, Hui JZ, Muzykantov VR, Tsourkas A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science.* 2012;338(6109):903–10.

267. Van Speybroeck M, Barillaro V, Thi T Do, Mellaerts R, Martens J, Van Humbeeck J, Vermant J, Annaert P, Van den Mooter G, Augustijns P. Ordered mesoporous silica material SBA-15: a broad-spectrum formulation platform for poorly soluble drugs. *J Pharm Sci.* 2009;98(8):2648–58.
268. Mellaerts R, Aerts CA, Van Humbeeck J, Augustijns P, Van den Mooter G, Martens JA. Enhanced release of itraconazole from ordered mesoporous SBA-15 silica materials. *Chem Commun (Camb).* 2007;(13):1375–7.
269. Lee JE, Lee N, Kim H, Kim J, Choi SH, Kim JH, Kim T, Song IC, Park SP, Moon WK, Hyeon T. Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. *J Am Chem Soc.* 2010;132(2):552–7.
270. Meng H, Xue M, Xia T, Ji Z, Tarn DY, Zink JI, Nel AE. Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model. *ACS Nano.* 2011;5(5):4131–44.
271. Wang T, Chai F, Fu Q, Zhang L, Liu H, Li L, Liao Y, Su Z, Wang C, Duan B, Ren D. Uniform hollow mesoporous silica nanocages for drug delivery in vitro and in vivo for liver cancer therapy. *J Mater Chem.* 2011;21(14):5299.
272. Hillegass JM, Blumen SR, Cheng K, MacPherson MB, Alexeeva V, Lathrop SA, Beuschel SL, Steinbacher JL, Butnor KJ, Ramos-Niño ME, Shukla A, James TA, Weiss DJ, Taatjes DJ, Pass HI, Carbone M, Landry CC, Mossman BT. Increased efficacy of doxorubicin delivered in multifunctional microparticles for mesothelioma therapy. *Int J Cancer.* 2011;129(1):233–44.
273. Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI, Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small.* 2010;6(16):1794–805.
274. Li L, Tang F, Liu H, Liu T, Hao N, Chen D, Teng X, He J. In vivo delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy. *ACS Nano.* 2010;4(11):6874–82.
275. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater.* 2009;8(1):15–23.
276. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM V, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater.* 2009;8(7):543–57.
277. Meng H, Yang S, Li Z, Xia T, Chen J, Ji Z, Zhang H, Wang X, Lin S, Huang C, Zhou ZH, Zink JI, Nel AE. Aspect ratio determines the quantity of mesoporous



- silica nanoparticle uptake by a small GTPase-dependent macropinocytosis mechanism. *ACS Nano*. 2011;5(6):4434–47.
278. Gao H, Shi W, Freund LB. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9469–74.
279. Yang K, Ma Y-Q. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(8):579–83.
280. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(33):11613–8.
281. Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee S-Y, Chiappini C, Liu X, Ferrari M. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J Control Release*. 2010;141(3):320–7.
282. Tao Z, Toms B, Goodisman J, Asefa T. Mesoporous silica microparticles enhance the cytotoxicity of anticancer platinum drugs. *ACS Nano*. 2010;4(2):789–94.
283. Yu T, Malugin A, Ghandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity. *ACS Nano*. 2011;5(7):5717–28.
284. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett*. 2006;6(4):662–8.
285. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol*. 2009;11(5):510–20.
286. Dharmawardhane S, Schürmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell*. 2000;11(10):3341–52.
287. Sandgren KJ, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, McInerney GM, Byth-Wilson K, Robinson PJ, Cunningham AL. A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000866.
288. Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano Lett*. 2008;8(3):941–4.
289. Slowing II, Wu C-W, Vivero-Escoto JL, Lin VS-Y. Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small*. 2009;5(1):57–62.

290. Zhao Y, Sun X, Zhang G, Trewyn BG, Slowing II, Lin VS-Y. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano*. 2011;5(2):1366–75.
291. Kwon KD, Vadillo-Rodriguez V, Logan BE, Kubicki JD. Interactions of biopolymers with silica surfaces: Force measurements and electronic structure calculation studies. *Geochim Cosmochim Acta*. 2006;70(15):3803–19.
292. Bayerl TM. A glass bead game. *Nature*. 2004;427(6970):105–6.
293. Mornet S, Lambert O, Duguet E, Brisson A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy. *Nano Lett*. 2005;5(2):281–5.
294. Zhao Y, Sun X, Zhang G, Trewyn BG, Slowing II, Lin VS-Y. Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS Nano*. 2011;5(2):1366–75.
295. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):21–33.
296. Discher DE, Janmey P, Wang Y-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005;310(5751):1139–43.
297. He Q, Shi J. Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility. *J Mater Chem*. 2011;21(16):5845.
298. Slowing I, Trewyn BG, Lin VS-Y. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J Am Chem Soc*. 2006;128(46):14792–3.
299. Lu J, Liang M, Sherman S, Xia T, Kovoichich M, Nel AE, Zink JJ, Tamanoi F. Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy: Energy-Dependent Cellular Uptake and Delivery of Paclitaxel to Cancer Cells. *Nanobiotechnology*. 2007;3(2):89–95.
300. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002;1(1):19–30.
301. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*. 2003;3(1):17–22.
302. Rocamora-Reverte L, Carrasco-García E, Ceballos-Torres J, Prashar S, Kaluderović GN, Ferragut JA, Gómez-Ruiz S. Study of the anticancer properties of tin(IV) carboxylate complexes on a panel of human tumor cell lines. *ChemMedChem*. 2012;7(2):301–10.
303. Li Y, Liu J, Li Q. Mechanisms by which the antitumor compound di-n-butyl-di-(4-chlorobenzohydroxamate)tin(IV) induces apoptosis and the mitochondrial-

- mediated signaling pathway in human cancer SGC-7901 cells. *Mol Carcinog.* 2010;49(6):566–81.
304. Berns A. Senescence: a companion in chemotherapy? *Cancer Cell.* 2002;1(4):309–11.
  305. Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(7):503–11.
  306. Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(1):51–7.
  307. Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E, Chen S-YJ, Wu DY. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* 2005;65(7):2795–803.
  308. Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* 2003;63(11):2705–15.
  309. Te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2002;62(6):1876–83.
  310. Wang X, Wong SC, Pan J, Tsao SW, Fung KH, Kwong DL, Sham JS, Nicholls JM. Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res.* 1998;58(22):5019–22.
  311. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell.* 2002;109(3):335–46.
  312. Chabner BA, Roberts TG. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(1):65–72.
  313. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007;445(7128):656–60.
  314. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 2005;436(7051):725–30.
  315. Wu C-H, van Riggelen J, Yetil A, Fan AC, Bachireddy P, Felsher DW. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(32):13028–33.

316. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436(7051):642.
317. Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, Cheng K, Varmeh S, Kozma SC, Thomas G, Rosivatz E, Woscholski R, Cignetti F, Scher HI, Pandolfi PP. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(3):681–93.
318. Wang Y, Meng A, Zhou D. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase uncouples H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2004;298(1):188–96.
319. Chen QM. Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908(1):111–25.
320. Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4130–4.
321. Qin S, Chock PB. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase membrane recruitment in hydrogen peroxide-induced activation of PI3K and Akt. *Biochemistry*. 2003;42(10):2995–3003.
322. Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J*. 1998;336(1):241–6.
323. Tu VC, Bahl JJ, Chen QM. Signals of oxidant-induced cardiomyocyte hypertrophy: key activation of p70 S6 kinase-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(3):1101–10.
324. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clement M, Lallemand D, Ortonne J-P, Ballotti R. Mitogen-activated Protein Kinase Pathway and AP-1 Are Activated during cAMP-induced Melanogenesis in B-16 Melanoma Cells. *J Biol Chem*. 1995;270(41):24315–20.
325. Wong G, Pawelek J. Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells. *Nature*. 1975;255(5510):644–6.
326. Khaled M, Larribere L, Bille K, Aberdam E, Ortonne J-P, Ballotti R, Bertolotto C. Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J Biol Chem*. 2002;277(37):33690–7.

327. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2007;11(2):191–205.
328. Galibert MD, Carreira S, Goding CR. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J*. 2001;20(17):5022–31.
329. Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, Komnenovic V, Scheuch H, Beug H, Wagner EF. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet*. 2007;39(6):741–9.
330. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537–49.
331. Lee J-J, Lee J-H, Ko Y-G, Hong SI, Lee J-S. Prevention of premature senescence requires JNK regulation of Bcl-2 and reactive oxygen species. *Oncogene*. 2010;29(4):561–75.
332. Wada T, Joza N, Cheng HM, Sasaki T, Kozieradzki I, Bachmaier K, Katada T, Schreiber M, Wagner EF, Nishina H, Penninger JM. MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol*. 2004;6(3):215–26.
333. Cañestro C, Yokoi H, Postlethwait JH. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat Rev Genet*. 2007;8(12):932–42.
334. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(9):678–89.
335. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284(5415):770–6.
336. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):756–67.
337. Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee S-Y, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21(1):70–8.
338. Moriyama M, Osawa M, Mak S-S, Ohtsuka T, Yamamoto N, Han H, Delmas V, Kageyama R, Beermann F, Larue L, Nishikawa S-I. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol*. 2006;173(3):333–9.

339. Osawa M, Fisher DE. Notch and melanocytes: diverse outcomes from a single signal. *J Invest Dermatol.* 2008;128(11):2571–4.
340. Balint K, Xiao M, Pinnix CC, Soma A, Veres I, Juhasz I, Brown EJ, Capobianco AJ, Herlyn M, Liu Z-J. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3166–76.
341. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004;303(5663):1483–7.
342. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):11–26.
343. Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, Rosenbaum LE, Platt JT, Gould Rothberg BE, Taketo MM, Dankort D, Rimm DL, McMahon M, Bosenberg M.  $\beta$ -catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell.* 2011;20(6):741–54.
344. Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature.* 2009;462(7273):595–601.
345. Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, Blasco MA, Serrano M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature.* 2009;460(7259):1136–9.
346. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000;24(4):372–6.
347. Hendrix MJC, Seftor EA, Seftor REB, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit L-M. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):246–55.
348. Ramgolam K, Lauriol J, Lalou C, Lauden L, Michel L, de la Grange P, Khatib A-M, Aoudjit F, Charron D, Alcaide-Loridan C, Al-Daccak R. Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One.* 2011;6(4):e18784.
349. Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet J-P, Ramaswamy S, Kuo W-L, Gray JW, Naber SP, Weinberg RA. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet.* 2005;37(10):1047–54.
350. Borrull A, Ghislin S, Deshayes F, Lauriol J, Alcaide-Loridan C, Middendorp S. Nanog and Oct4 overexpression increases motility and transmigration of melanoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(7):1145–54.

351. McCarthy N. Metastasis: Moved to act. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):3.
352. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):362–74.
353. Croft DR, Olson MF. Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement. *Cancer Cell*. 2008;14(5):349–51.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Mirna Bulatović rođena je 8. januara 1985. godine u Podgorici, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Školske 2003/04 upisala je studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer biohemija, gde je 2009. godine diplomirala sa prosečnom ocenom 9,29. Diplomski rad pod naslovom: „Fiziološko-biohemijska i hemotaksonomska karakterizacija bakterija izolovanih iz eksperimentalne naftne bušotine” uradila je u laboratoriji Odeljenja za mikrobiološku hemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Miroslava Vrvića. Školske 2010/11 upisala je prvu godinu doktorskih studija na modulu Imunobiologija Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” od 1. juna 2011. godine, a zvanje istraživača saradnika stiče 24. maja 2012. godine. Odluku o reizboru istraživačkog zvanja, Naučno veće Instituta donelo je 9. juna 2015. godine. Boravila je, kao student na razmeni u okviru DAAD projekta, na Martin-Luter-Univerzitetu Hale-Vitenberg, Hale, Nemačka dva meseca 2012/13. Mirna Bulatović je do danas objavila 11 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 5 saopštenja na međunarodnim i 3 na domaćim naučnim skupovima.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Мирна Булатовић

број уписа Б3058/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање антитуморског деловања 6-[трифенилстанил]-1-хексанола везаног за мезопорозни наноматеријал SBA-15 у моделу мишјег меланома *iv vitro* и *in vivo*

- 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, 20.07.2015.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирна Булатовић

Број уписа Б3058/2010

Студијски програм Имунобиологија

Наслов рада Испитивање антитуморског деловања 6-[трифенилстанил]-1-  
хексанола везаног за мезопорозни наноматеријал SBA-15 у моделу мишјег  
меланома *in vitro* и *in vivo*

Ментор др Данијела Максимовић-Иванић и др Александра Кораћ

Потписана Мирна Булатовић

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.

**Потпис докторанда**

У Београду, 20.07.2015.

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Испитивање антитуморског деловања 6-[трифенилстанил]-1-хексанола везаног за мезопорозни наноматеријал SBA-15 у моделу мишјег меланома *iv vitro* и *in vivo*

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 одлучила.

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).

**Потпис докторанда**

У Београду, 20.07.2015.

---

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.