

Broj 2 • septembar 2022. N° 2 • September 2022.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2022.
IMGGI • IMGGE

Pedesetogodišnjica osnivanja studijskog programa molekularna biologija i fiziologija Gordana Matić	8	50th anniversary of the molecular biology and physiology study program
TRPV1: Ciljno mesto dejstva lekova u terapiji različitih stanja Branislava Medić Brkić, Katarina Savić Vujović, Dragana Srebro, Sonja Vučković	15	TRPV1: A Promising drug target for the treatment of various conditions
Geni-modifikatori β -talasemijskih sindroma – novi terapijski pristupi Milena Ugrin	32	Gene modifiers in β -thalassemia syndromes – a new therapy approach
Novi uvid u genetiku naslednih perifernih neuropatija Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dusan Keckarević	51	Genetics of inherited peripheral neuropathies: renewed data
Savremeni pristupi u istraživanju molekularne osnove karcinoma prostate Zorana Dobrijević, Suzana Matijašević-Joković, Ana Branković, Ana Djordjević, Milica Popović i Goran Brajušković	63	Modern approaches in research of the molecular basis of prostate cancer
Uticaj tumorske mikrosredine na razvoj i progresiju maligniteta Ilona Đorić, Tijana Išić Denčić, Sonja Šelemetjev	75	The effects of tumor microenvironment on malignancy formation and progression
Uloga hsa-miR-93-5p u kolorektalnom karcinomu Jovana Despotović	90	Role of hsa-miR-93-5p in colorectal cancer Jovana Despotović
Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona Marijana B. Živković	104	Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives
Molekularna dijagnostika glioblastoma – klinički uticaji <i>IDH</i> mutacija i epigenetičkog utišavanja aktivnosti <i>MGMT</i> gena Nikola Jovanović, Tatjana Mitrović	125	Molecular diagnostics of glioblastoma – clinical impact of <i>IDH</i> mutations and epigenetic silencing of <i>MGMT</i>
Molekularni profil timoma Jelena Perić	143	Molecular profile of thymoma
Ekspresija i funkcija insulina u centralnom nervnom sistemu Tamara Dakić, Predrag Vujović	155	Insulin expression and action in the central nervous system
Neuroprotektivni potencijal progesterona Ivana Guševac Stojanović, Dunja Drakulić	168	Neuroprotective progesterone potential
Uloga dehidroepiandrosterona u moždanoj ishemiji/reperfuziji Marina Zarić Kontić, Jelena Martinović	186	Effect of dehydroepiandrosterone on cerebral ischemia/reperfusion
Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze Neda Đorđević	206	Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties
Dihidrohalkoni jabuke florizin i floretin kao nove alelopatske supstance Mariana Stanišić, Slavica Ninković, Nevena Banjac	223	Apple dihydrochalcones phloridzin and phloretin as novel allelochemicals
Dosadašnja postignuća na promeni boje cvetova biljaka metaboličkom modulacijom biosinteze karotenoida Milena Trajković, Sladjana Jevremović, Aleksandar Cingel	238	Recent advances in flower color alteration by metabolic manipulation of carotenoid biosynthesis
Bioinformatički alati za analizu mikroRNK Katarina Zeljić	255	Bioinformatics tools for the analysis of microRNA
Marker porekla kao adut u forenzičkim analizama DNK u kompleksnim slučajevima iz perspektive Y hromozoma Miljana Kecmanović, Milica Keckarević Marković, Dušan Keckarević	275	Lineage marker as a key player in complex forensic cases from the perspective of Y chromosome

Predgovor

Uspostaviti tradiciju je mnogo teže nego realizovati inicijativu. Pokazalo se da je prvi broj tematskog zbornika **Trendovi u molekularnoj biologiji 1** pobudio interesovanje naučne zajednice u Srbiji, tako da drugi broj nije bilo teško sastaviti. Broj poglavlja u tematskom zborniku **Trendovi u molekularnoj biologiji 2** je premašio očekivanja. Kao da je Tematski zbornik simbolično postao - Ko je ko u molekularnoj biologiji u Srbiji. I ponovo se pokazalo da se naučnici u našoj zemlji bave aktuelnim istraživačkim temama i aktivno doprinose napretku molekularne biologije na mnogim poljima. I mladi molekularni biolozi su prikazom svojih doktorskih teza pokazali da prate svetske trendove i savremene naučne pristupe.

Posebnost ovog broja je što se objavljuje u vreme kada obeležavamo jubilej, pedesetogodišnjicu Beogradske škole molekularne biologije, o čemu svedoči tekst u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Pre više godina na jednom naučnom skupu se govorilo o tome kako saznanja iz molekularne biologije prožimaju sve naučne oblasti koje se bave živim organizmima i kako se može predvideti da će njena primena obeležiti novi vek. Iz auditorijuma je stigao komentar: „Proći će i vaše“. Vreme svedoči da je era molekularne biologije tek počela.

„I šta ćemo sad?“

Sonja Pavlović

Iz recenzija Tematskog zbornika *Trendovi u molekularnoj biologiji*

Drugi broj tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ predstavlja nastavak prikazivanja i objavljivanja najznačajnijih naučnih radova proisteklih iz doktorskih disertacija mladih naučnika Srbije, kao i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u svetu u oblasti molekularne biologije, u protekloj godini, u kojima su naši naučnici dali svoj doprinos. U ovom broju, prikazano je 18 naučnih radova, od kojih je 12 iz oblasti biomedicine, koji su posvećeni rezultatima ostvarenim u oblasti molekularne biologije retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Ovi rezultati su od ogromnog značaja za unapređenje dijagnostike i terapije bolesti.

Rezultati koje su naši naučnici ostvarili u oblasti molekularne biologije biljaka prikazani su kroz tri rada, a akcenat u njima je na mogućnosti primene tih rezultata u oblasti ekologije, hortikulture i unapređenja zdravlja ljudi (potraga za ekološki prihvatljivim bioherbicidima, modifikacija boje cveta, biološka aktivnost prirodnih supstanci).

Dva rada su posvećena naprednim metodama u oblasti molekularne biologije i prikazana su u posebnom poglavlju, što smatram veoma važnim.

Posebno bih istakla poglavlje u kojem je prikazan jedan od najznačajnijih naučnih rezultata u svetu u protekloj godini (otkiće receptora za temperaturu i dodir), za koji je dodeljena Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2021. godine. Uvodno poglavlje ovog tematskog zbornika posvećeno je značajnom jubileju – pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, i u njemu je prikazan razvojni put studijskog programa Molekularna biologija i fiziologija na Univerzitetu u Beogradu – Biološkom fakultetu.

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ nastavlja svoju misiju naučne avangarde započetu prošlogodišnjim brojem. Prikazivanjem najkvalitetnijih i najznačajnijih naučnih rezultata ostvarenih u oblasti molekularne biologije u protekloj godini u kojima su naši mladi naučnici dali svoj ogromni doprinos, prenose se informacije širem krugu istraživača i zaposlenih u različitim oblastima (medicina, farmacija, poljoprivreda), čime se otvaraju mogućnosti za saradnju, a samim tim za primenu rezultata, kao i za nova istraživanja.

Svojom koncepcijom i odabirom radova „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ prate napredak u oblasti molekularne biologije i ne samo da prenose najznačajnije naučne rezultate, već i inspirišu i podstiču nova istraživanja i šire interesovanje za ovu veoma značajnu naučnu oblast. Ovaj zbornik opravdava svoj naziv i nadam se da će se nastaviti trend njegovog objavljivanja i narednih godina.

**Dr Svetlana Radović, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Monografija/Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je drugi broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 8 predstavlja revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 7 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, pedesetogodišnjici Beogradske škole molekularne biologije, u kome je prikazan put razvoja programa za molekularnu biologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Posebno je značajno poglavlje u kome je prikazan doprinos naših istraživača u oblasti kojoj je dodeljena Nobelova nagrada iz medicine za 2021. godinu (receptori za temperaturu i dodir).

Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi u svetu mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji. Ovaj Tematski zbornik je svedočanstvo o značajnim postignućima molekularnih biologa u Srbiji koji su doneli napredak našoj medicini i drugim naučnim oblastima.

Monografija/Zbornik je izuzetno zanimljivo koncipiran sa sadržajem koji je na visokom naučnom nivou i koje je značajan izvor informacija za veliki broj naučnika u Srbiji čija se istraživanja više ne mogu zamisliti bez molekularne biologije. Primeri primenljivosti rezultata istraživanja u praksi (medicinskoj i drugima) je poseban kvalitet ovog Zbornika.

Prvi broj Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1“ je doživeo veliko interesovanje. Interesovanje autora da objave svoj doprinos svetskoj nauci u broju 2 govori da je ovakav sadržaj bio neophodan našoj naučnoj javnosti. Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine i drugih oblasti (biotehnologija, poljoprivreda, farmacija) nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije

**Dr Vesna Škodrić Trifunović, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ sadrži naučne rezultate koji su prepoznati na svetskom nivou, a koje su istraživači iz Srbije ostvarili u prethodnoj godini iz ove oblasti. Zbornik je sačinjen od 18 poglavlja, preglednih radova, grupisanih u pet celina. Prva celina je posvećena važnom jubileju, pedesetogodišnjici osnivanja Beogradske škole molekularne biologije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, dok druga sadrži prikaz rezultata naših istraživača iz oblasti fiziologije i medicine za koju je u 2021. godini dodeljena Nobelova nagrada. Najveći broj poglavlja je u okviru treće celine koja se bavi biomedicinom i to molekularnom biologijom retkih bolesti, tumora i centralnog nervnog sistema. Preostale dve celine su posvećene molekularnoj biologiji biljaka i naprednim metodama molekularne biologije. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 8 poglavlja u okviru biomedicine i molekularne biologije biljaka predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija.

Značaj ovog Zbornika je višestruk. Najpre, već drugu godinu za redom se objavljuju najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti koja su proizašla iz rada istraživača iz Srbije i dostupna su široj javnosti na maternjem jeziku. Takođe, svoje radove su napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (5) i fakulteta (5) iz Srbije, što ohrabruje da će se u našoj zemlji i dalje nastaviti sa istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu.

„Trendovi u molekularnoj biologiji 2“ je Tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji u prethodnoj godini. Korišćenjem najnovijih metodoloških pristupa u ovoj oblasti, ali i bioinformatičkih i drugih softverskih alata, postignut je značajan napredak u dijagnozi i primeni novih strategija lečenja mnogih bolesti, forenzičkim analizama, razvoju novih lekova. Ovaj sveobuhvatni prikaz istraživanja, koja se aktivno sprovode u naučnim institutima i na fakultetima u Srbiji, doprinosi saznanjima o značaju koji molekularna biologija ima kako u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, farmaciji, tako i u razvoju biotehnologije, očuvanju životne sredine i biodiverziteta.

Poseban doprinos Zbornika se ogleda u tome što se u njemu nalaze aktuelni podaci o dostupnosti navedenih savremenih metodologija, čime se otvaraju realne mogućnosti za uspostavljanje novih saradnji među istraživačima, kao i u uspostavljanju inter- i multi-disciplinarnosti i daljem razvoju nauke u Srbiji.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Antitumorski potencijal novih derivata steroidnih hidrazona

Marijana B. Živković

Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Centar za hemiju, Njegoševa 12, 11000 Beograd, Republika Srbija
Kontakt: marijana.zivkovic@ihtm.bg.ac.rs

Apstrakt

Kako maligne ćelije vremenom mutiraju i postaju rezistentne na postojeće lekove postoji stalna potreba za novim antitumorskim lekovima. Steroidni molekuli igraju vrlo važne uloge u biološkim sistemima. Usled hidrofobnosti nesmetano prolaze kroz ćelijske membrane pa su pogodan polazni materijal za dizajn novih lekova. Transformacijama krutog tetracikličnog steroidnog skeleta nastaju biološki aktivni molekuli sa novim fiziološkim funkcijama. Sa druge strane, hidrazoni sadrže heteroatome i smatraju se značajnim intermedijerima pri sintezi heterocikličnih jedinjenja. Stoga je sintetisano i okarakterisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona, a zatim je određena njihova citotoksičnost i ispitani su mehanizmi citotoksičnog delovanja.

Prema testiranim malignim ćelijskim linijama (HeLa, K562, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS174, A549), naročito prema HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa i prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije, nova jedinjenja su ispoljila selektivnu citotoksičnost zavisnu od koncentracije na mikrogramskoj skali, u mnogim slučajevima bolju od hemioterapeutika cisplatina. Nasuprot tome, pokazala su vrlo slabu citotoksičnost na humane PBMC, što se ogleda u koeficijentima selektivnosti daleko višim od vrednosti 2,5. Morfološkom analizom HeLa ćelija tretiranih novim derivatima utvrđeno je njihovo pro-apoptotsko dejstvo što je potvrđeno rezultatima protočne citometrije. Određivanjem ciljnih kaspaza ustanovljeno je da do apoptoze dolazi posredstvom kaspaze-3, -8 i -9. Svi ispitivani derivati su pokazali sposobnost da inhibiraju angiogenezu ćelija EA.hy926 in vitro. Testirani tiazolidin-4-oni nisu prouzrokovali značajne promene u nivoima ekspresije gena MMP2, MMP9 i VEGFA u tretiranim HeLa ćelijama.

Rezultati sprovedenih in vitro istraživanja mogu da ukažu na značajan antitumorski potencijal što ova jedinjenja ubraja u potencijalne kandidate za in vivo ispitivanja.

Ključne reči: steroidni hidrazoni, citotoksičnost, apoptoza, angiogeneza, ekspresija gena, ćelijski ciklus.

Antitumor potential of new steroidal hydrazone derivatives

Marijana B. Živković

University of Belgrade – Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy,
Department of chemistry, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Republic of Serbia
Correspondence: marijana.zivkovic@ihtm.bg.ac.rs

Abstract

As malignant cells mutate over time and become resistant to existing drugs, there is a constant need for new antitumor drugs. Steroid molecules play very important roles in biological systems. Due to hydrophobicity, they pass through cell membranes unhindered, so they are a suitable starting material for the new drugs design. Biologically active molecules with new physiological functions are created by transformations of the solid tetracyclic steroid skeleton. Therefore, fifty new steroidal hydrazone derivatives were synthesized and characterized, afterwards their cytotoxicity was determined, and the mechanisms of cytotoxic action were investigated.

According to the tested malignant cell lines (HeLa, K562, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS174, A549), especially according to HeLa cells of cervical adenocarcinoma, and K562 cells of chronic myeloid leukemia, the new compounds showed concentration-dependent selective cytotoxicity on a microgram scale, in many cases better than chemotherapeutic cisplatin. In contrast, they showed very low toxicity to human PBMC, which is reflected in selectivity coefficients far higher than 2.5. By morphological analysis of HeLa cells treated with new derivatives their pro-apoptotic effect was determined, which was confirmed by the results of flow cytometry. By determining the target caspases, it was established that apoptosis is mediated by caspases-3, -8, and -9. All derivatives tested showed the ability to inhibit EA.hy926 cells angiogenesis *in vitro*. Thiazolidin-4-ones tested did not cause significant changes in MMP2, MMP9, and VEGFA gene expression levels in treated HeLa cells.

The results of *in vitro* studies may indicate significant anticancer potential, which makes these compounds potential candidates for *in vivo* testing.

Keywords: steroidal hydrazones, cytotoxicity, apoptosis, angiogenesis, gene expression, cell cycle

1. UVOD

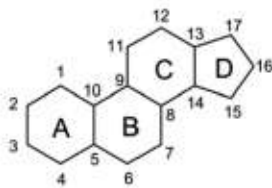
Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije rak, što po učestalosti pojavljivanja što po smrtnosti, zauzima drugo mesto na listi nezaraznih bolesti – odmah posle kardiovaskularnih oboljenja. Brza mutacija malignih ćelija i pojava rezistencije na postojeće lekove opravdavaju postojanje ogromnog broja istraživanja na polju raka i nastojanje da se pronađu novi lekovi protiv ove opake bolesti.

Steroidi predstavljaju grupu široko rasprostranjenih biološki aktivnih molekula koji imaju veoma važne uloge u biološkim sistemima. Zbog toga su transformacije krutog tetracikličnog sistema koje izazivaju promene u njihovim fiziološkim funkcijama i koje vode ka stvaranju novih biološki aktivnih molekula postale jedan od glavnih ciljeva današnje steroidne hemije. U tom pogledu naročito se ističu modifikacije koje uključuju uvođenje heteroatoma (azot, sumpor, kiseonik), novih funkcionalnih grupa i heterocikličnih prstenova.

Tako je u okviru disertacije iz koje proističe ovaj revijalni rad, u nadi da će posedovati značajan potencijal za razvijanje novih selektivnih antikancerskih agenasa, sintetisano i detaljno okarakterisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona, a zatim je određena njihova citotoksičnost i ispitani su mehanizmi citotoksičnog delovanja.

2. STEROIDNI MOLEKULI

Steroidi spadaju u klasu lipida sa tetracikličnim jezgrom prikazanim na **Shemi 1**. Razlikuju se po bočnim nizovima i funkcionalnim grupama koje sadrže.



Shema 1. Tetraciklično jezgro zajedničko za sve steroidne molekule

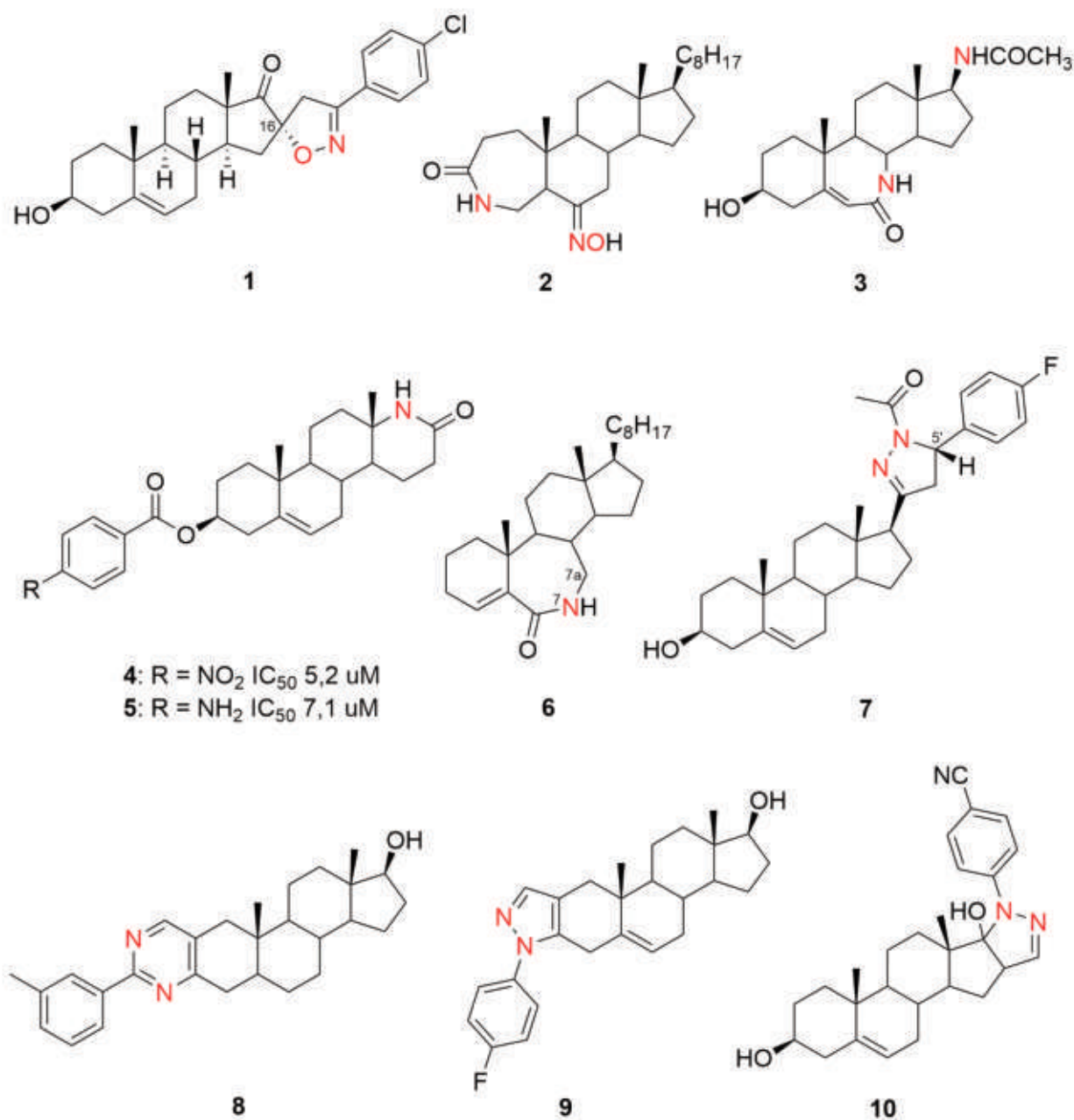
Ugljovodonični skelet steroida je hidrofoban što im omogućava neometan prolazak kroz ćelijske membrane. Upravo zbog toga predstavljaju značajan polazni skelet za dizajniranje antikancerskih lekova. Polarne funkcionalne grupe endogenih steroida, hidroksilna, fenil- ili keto-grupa, od ključnog su značaja za vezivanje steroida za receptore pri čemu njihovo prisustvo ne menja hidrofobnu prirodu steroidnog molekula kao celine [1]. Steroidni molekuli su uglavnom hormoni, osim holesterola koji ima i mnoštvo nehormonskih uloga, te su u telu prisutni u miligramskim količinama [2]. Ogroman interes naučne zajednice današnjice za steroidne hormone je posledica njihove uloge u kancerogenezi hormonski zavisnih tumora kao što su maligni tumori dojke, jajnika, prostate i testisa. Kako je rak kao skup oboljenja pri samom vrhu liste nezaraznih bolesti na globalnom nivou [3] opravdana su mnogobrojna nastojanja naučnika da pronađu nove antikancerske lekove.

2.1. FUNKCIONALIZACIJA STEROIDNIH MOLEKULA

Promenom strukture steroidnih molekula menjamo biološka svojstva istih. Jedan od najznačajnijih načina za funkcionalizaciju steroidnih molekula, a samim tim i za proširenje već širokog spektra bioloških aktivnosti steroida, jeste uvođenje heteroatoma (N, O, S, P), bočnih nizova koji sadrže heteroatome i heterocikličnih prstenova u steroidni skelet. Heteroatomi u krutom steroidnom skeletu igraju ulogu donora i

akceptora vodoničnih veza čime omogućavaju efikasno povezivanje sa ciljnim enzimima i receptorima. Uvođenjem heteroatoma u neki molekul menja se njegova lipofilnost ili povećava rastvorljivost u vodi čime se poboljšavaju farmakokinetička i farmaceutska svojstva tog molekula [4]. Prednosti steroidnih u odnosu na ostale hemioterapeutike su njihova visoka biodostupnost u ćeliji, manja toksičnost od ostalih i manja verovatnoća za razvoj rezistencije na veliki broj lekova (*multidrug resistance*, MDR) [5].

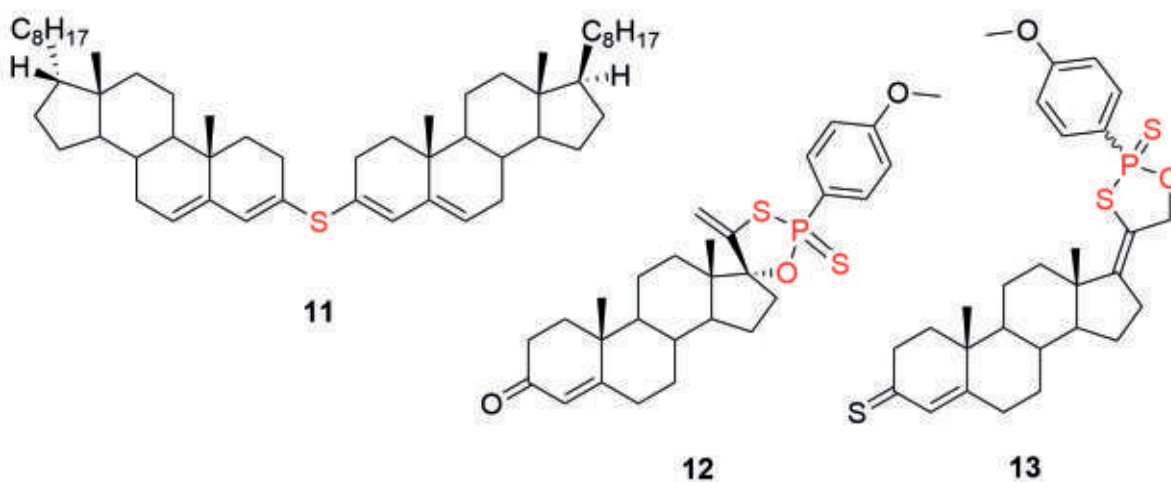
Na **Shemi 2** prikazano je nekoliko heterosteroidnih molekula iz literature za koje se ispostavilo da ispoljavaju antitumorsku aktivnost.



Shema 2. Heterosteroidi sa antikancerskom aktivnošću [6–13]

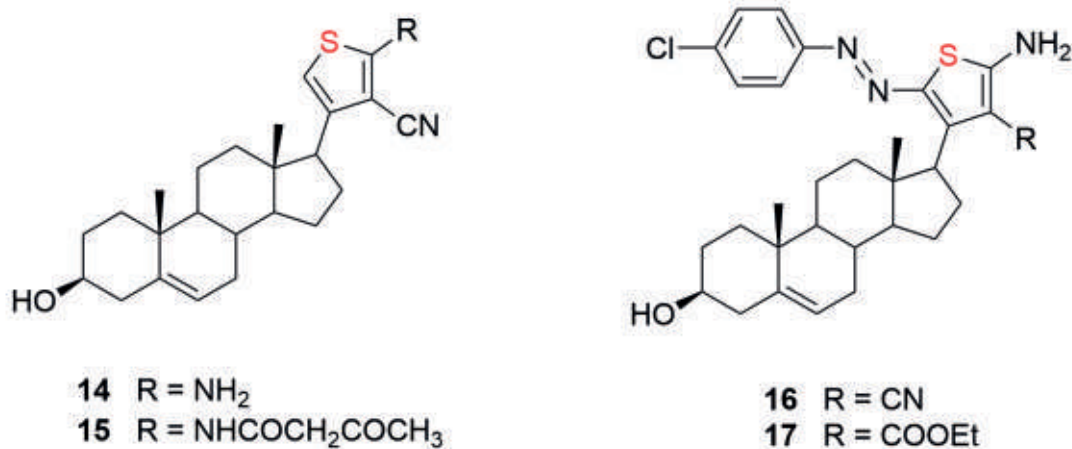
Naime, 16-spiroizoksazolin (**1**) autorke Frank i saradnika je pokazao značajnu antikancersku aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma cerviksa HeLa (IC_{50} 7,4 μ M) [6]. Huang i saradnici su sintetisali holestanski A-aza-heterosteroid (**2**) čiji se mehanizam antikancerskog delovanja ogleda u pokretanju unutrašnjeg puta apoptoze u malignim ćelijama prostate [7]. Počev od 3β -acetoksipregnenolona Koutsourea i saradnici su sinteisali B-laktam (**3**) koji karakteriše smanjena toksičnost i impresivan antikancerski potencijal prema ćelijskoj liniji leukemije P388. Ovaj heterosteroid dovodi do izlečenja 4/6 miševa podvrgnutih eksperimentu [8]. 5-Androstenski D-laktami (**4** i **5**) Dhingre i saradnika ispoljili su dobru aktivnost na humanoj ćelijskoj liniji karcinoma prostate DU-145 u odnosu na lek finasterid kao pozitivnu kontrolu [9]. B-Laktam (**6**) enamidnog tipa autorke Krstić i saradnika ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama na mikrogramskoj skali pri čemu je aktivacija apoptoze bila jedan od mehanizama citotoksičnog dejstva [10]. Iványi i saradnici sintetisali su aza-egzonuklearne pirazolinil-pregnenolone koji inhibiraju rast malignih ćelija za više od 90% pri čemu se ispostavilo da je 5'S-epimer jedinjenja (**7**) daleko aktivniji [11]. A-kondenzovani piriimidin (**8**) Baji-ja i saradnika ispoljio je antikancersku aktivnost prema malignim ćelijskim linijama prostate, od kojih je izuzetno značajna aktivnost prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma prostate PC-3 koja vodi poreklo od metastaza u kostima (IC_{50} 9,1 μ M) [12]. Isti autori su ustanovili da uvođenje voluminoznih heteroprstenova kondenzovanih u položaju 2,3 ili 16,17 prisutnih u jedinjenjima **9** i **10** može da dovede do redukcije ili pak eliminacije hormonskog efekta androgena. Jedinjenje **9** ispoljilo je značajnu antikancersku aktivnost prema trostruko negativnom adenokarcinomu dojke MDA-MB-231 (IC_{50} 4,5 μ M), dok je jedinjenje **10** delovalo približno istim intenzitetom na ćelijsku liniju dukalnog karcinoma dojke T47D [13].

Pored najzastupljenijih aza-heterosteroida, steroida koji sadrže azot kao heteroatom, postoji značajan broj steroidnih jedinjenja sa uvedenim atomom sumpora ili fosfora [14-17].



Shema 3. Neki sumporni i fosforni heterosteroidi [15-17]

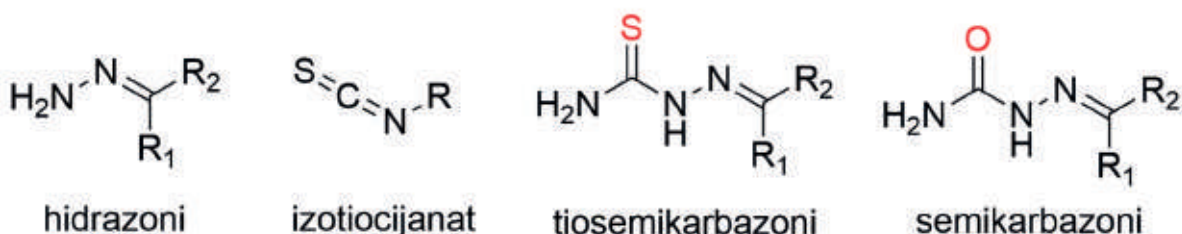
Holestanski sulfidni dimer (**11**, Shema 3) pokazao je dobru selektivnost za tumorske u odnosu na normalne ćelije pri čemu je citotoksična aktivnost na HeLa ćelije iznosila IC_{50} 21,2 μ M [17]. Kako u prirodi postoji mnoštvo organofosfornih jedinjenja sa značajnim biološkim aktivnostima [15] to je bio podstrek da autorka Krstić i saradnici sintetišu fosforne heterociklične derivate androst-4-ena (**12** i **13**) i ispitaju njihovu antikancersku aktivnost [15-16]. Ispostavilo se da derivat **13** sa tiokso-grupom u položaju C-3 ispoljava jaču antikancersku aktivnost prema K562 ćelijama od svog 3-okso analoga [16]. Mohareb i saradnici su sintetisali sumporne heterosteroide (**14-17**, Shema 4) koji se izdvajaju po svojoj antikancerskoj aktivnosti jačoj od aktivnosti doksorubicina [18].



Shema 4. Sumporni heterosteroidi sa antikancerskom aktivnošću [18]

2.2. HIDRAZONI

Hidrazoni su klasa organskih jedinjenja koja sadrže strukturni fragment prikazan na **Shemi 5**. Oni nastaju zamenom karbonilnog kiseonikovog atoma aldehida i ketona =NNH₂ grupom.

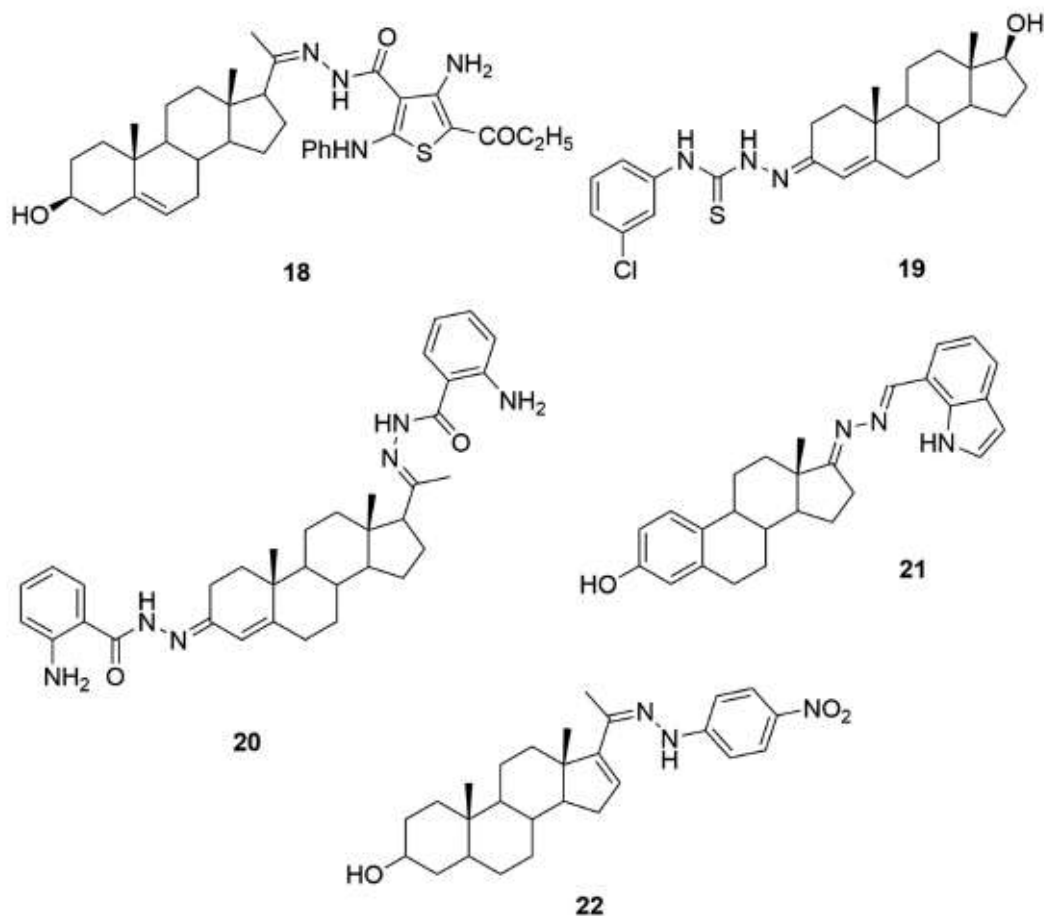


Shema 5. Opšta formula hidrazona, tiosemi- i semikarbazona

Hidrazoni se smatraju značajnim intermedijerima pri sintezi heterocikličnih jedinjenja [19]. Ispoljavaju mnoštvo različitih bioloških efekata od kojih su neki antituberkulozni [20], antifungalni [21] i antikancerski [22-24]. Dakle, hidrazoni čine važnu klasu jedinjenja za razvoj lekova čija je toksičnost svedena na minimum.

2.3. DERIVATI STEROIDNIH HIDRAZONA SA ANTITUMORSKOM AKTIVNOŠĆU

Mohareb i saradnici su sintetisali čitav niz različitih derivata steroidnih hidrazona kojima je potom određena citotoksična aktivnost. Mnoga od tih jedinjenja, među kojima i jedinjenje **18** prikazano na **Shemi 6**, ispoljila su bolju citotoksičnu aktivnost od doksorubicina na ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7 i liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 (IC₅₀ 0,01 μM) [5]. Jabeen i saradnici su ispitali antikancerska svojstva hidrazona dobijenih iz progesterona i testosterona. Testosteronski tiosemikarbazon (**19**) bio je aktivan prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke, MCF-7 (IC₅₀ 4,8 μM), dok je progesteronski semikarbazon (**20**) pokazao značajnu aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma prostate PC-3 (IC₅₀ 4 μM) [25]. Steroidne 17-hidrazone sa heterocikličnim prstenovima u bočnom nizu sintetisali su Cui i saradnici. Od njih, jedinjenje **21**, sa indolnim prstenom u bočnom lancu, ispoljilo je citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama (IC₅₀ < 5 μM) bolju od kontrolnog citostatika, cisplatina [26]. Od serije hidrazona koje su sintetisali Nadaria i saradnici izdvaja se hidrazon (**22**) koji je na ćelijskoj liniji karcinoma pluća A549 ispoljio citotoksičnu aktivnost (IC₅₀ 17,4 μM) u rangu kontrole, etoposida [27].



Shema 6. Steroidni hidrazoni koji poseduju antikancerску aktivnost [5, 25–27]

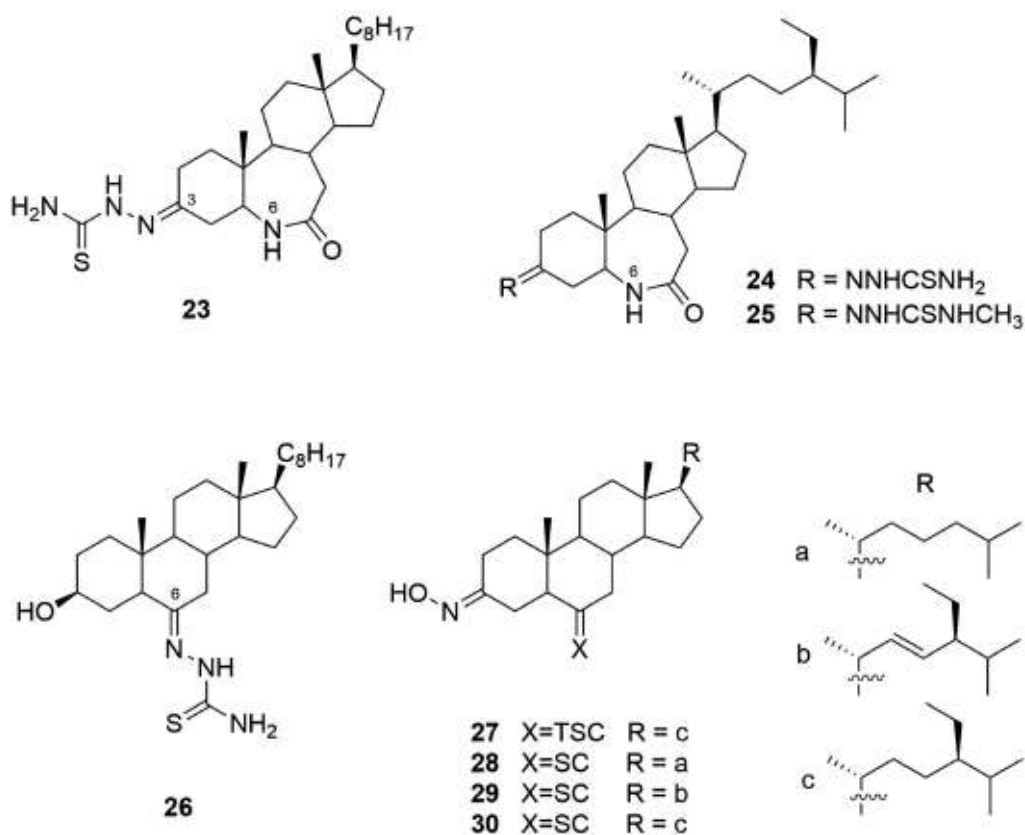
2.3.1. TIOSEMI/SEMIKARBAZONI I NJIHOVI DERIVATI

Tiosemikarbazoni i njihovi kiseionični analozi, semikarbazoni, su derivati hidrazona koji sadrže strukturne fragmente prikazane na **Shemi 5**.

Tiosemikarbazoni su vrlo korisni intermedijeri pri sintezi različitih heterocikličnih jedinjenja i helirajući su ligandi za metalne jone [28-37]. Pored toga, ispoljavaju čitav niz različitih bioloških efekata kao što su: smirujuće [38], miorelaksantsko, psihoanaleptičko i hipnotičko [39-41], antidepresivno [20], antimikrobno [21,23,42], antiameboidno [22], analgetičko, antiinflamatorno [24,43] i citotoksično dejstvo [44]. Farmakofora tiosemikarbazona sadrži izotiocijanatni motiv za koji je poznato da ima hemioprotektivno dejstvo [45].

Na **Shemi 7** su navedene strukture nekoliko steroidnih tiosemi- i semikarbazona iz literature koji su ispoljili bolju antikancerску aktivnost od hemioterapeutika cisplatina.

Tiosemikarbazon (**23**) Huang-a i saradnika bio je aktivan prema mnoštvu različitih malignih ćelijskih linija [46]. Cui i saradnici su, polazeći od sitosterola i stigmasterola, sintetisali B-homosteroidne laktame sa tiosemikarbazonim fragmentom smeštenim u položaj C-3. Derivati sitosterola pokazali su se kao bolji citotoksični agensi od kojih su jedinjenja **24** i **25** ispoljila izuzetnu citotoksičnu aktivnost na ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre, Bel-7404 (IC₅₀ 3,9 i 5,6 μM, redom) [47]. Derivati holesterola i stigmasterola, 6-tiosemi/semi-karbazoni (**26–30**) Gan-a i saradnika, takođe su ispoljili jaču citotoksičnu aktivnost od cisplatina prema Bel-7404 ćelijama [48].

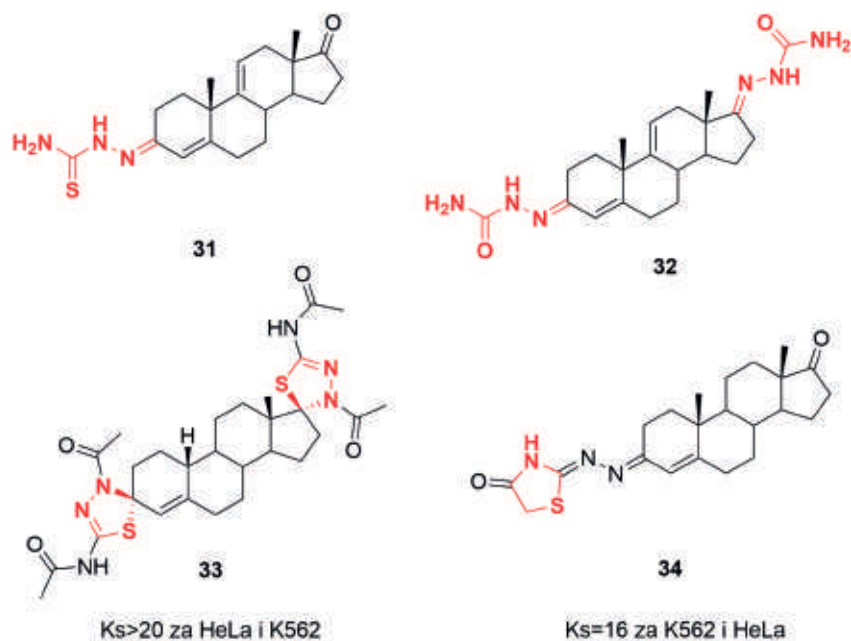


Shema 7. Steroidni tiosemi/semi-karbazoni sa antikancerskom aktivnošću [46–48]

U okviru disertacije iz koje proističe ovaj revijalni rad sintetisano je i okarakterisano pedeset novih α,β -nezasićenih steroidnih tiosemi/semi-karbazona i njihovih derivata nakon čega im je određena citotoksičnost, a potom su za najaktivnija jedinjenja ispitani mehanizmi citotoksičnog delovanja. 3-Tiosemikarbazon (**31**, Shema 8) je na tri maligne ćelijske linije, K562, MDA-MB-452 i A549, ispoljio citotoksičnost sa IC_{50} vrednostima nižim od $10 \mu\text{M}$ [49]. Za sintetisane semikarbazone i njihove derivate ispostavilo se da su imali daleko nižu citotoksičnu aktivnost od njihovih sumpornih analoga te je 3,17-bis(semikarbazon) (**32**) ispoljio umerenu citotoksičnost na ćelije HeLa [50].

1,3,4-Tijadiazolini, petočlani heterocikli koji sadrže dva atoma azota i atom sumpora, nastaju transformacijama tiosemikarbazona. Njihova strukturna podjedinica je sastavni deo prirodnih proizvoda kao što su hormoni, vitamini, antibiotici i alkaloidi. Literaturni podaci svedoče da tijadiazolini ispoljavaju mnoštvo različitih bioloških svojstava i ponašaju se kao analgetici, deluju antiinflamatorno, antimikrobno i antitumorski [33,51]. Novi 3,17-bis(tijadiazolin) (**33**) sintetisan u okviru ove disertacije ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema ćelijama HeLa i K562 na mikrogramskoj skali, dok su koeficijenti selektivnosti (Ks) za navedene maligne u odnosu na zdrave ćelije iznosili preko 20 [49].

1,3-Tiazolidin-4-oni, još jedna klasa organskih jedinjenja koja nastaje ciklizacijom tiosemikarbazona, derivati su petočlanog zasićenog tiazolidina koji je u prirodi prisutan u penicilinu [52]. Vođeni ovom činjenicom istraživači sintetišu tiazolidinone i ispituju njihov biološki profil. Tako su iz ove disertacije proistekle dve serije novih steroidnih tiazolidinona, među kojima je i jedinjenje **34**, koji su ispoljili izuzetnu citotoksičnost prema ispitivanim malignim ćelijskim linijama i imali Ks vrednosti daleko više od vrednosti 2,5 [53].

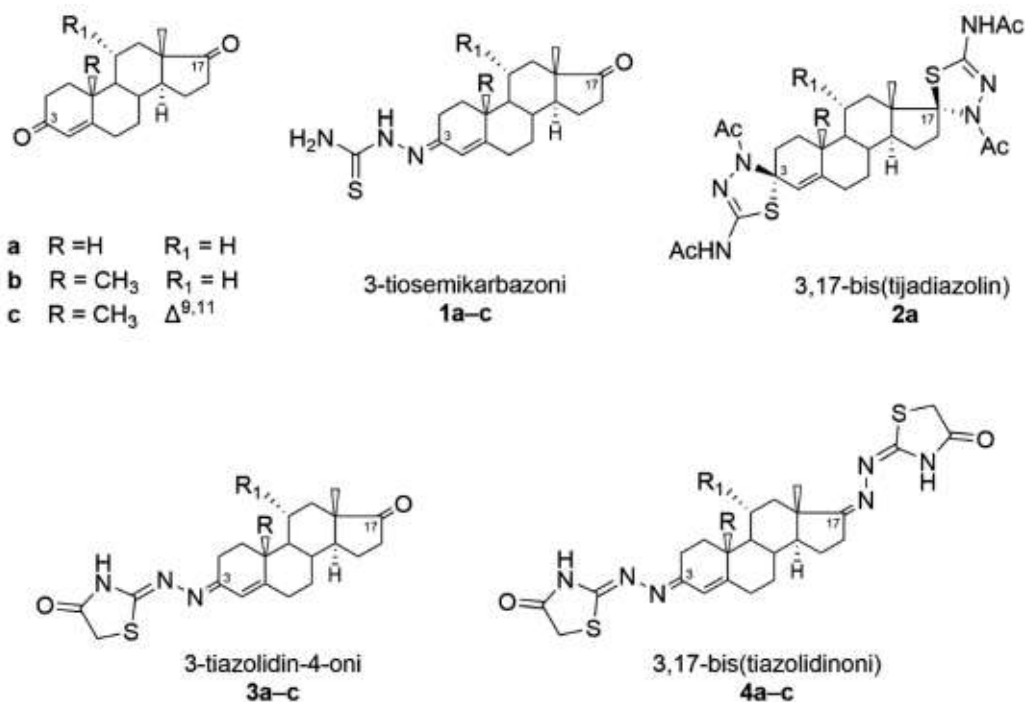


Shema 8. Tiosemi/semi-karbazoni i njihovi derivati sintetisani u okviru disertacije koji ispoljavaju citotoksičnu aktivnost [49,50,53]

3. CITOTOKSIČNOST I MEHANIZMI CITOTOKSIČNOG DELOVANJA

3.1. Citotoksična aktivnost novih derivata steroidnih hidrazona

Za sva nova jedinjenja urađena je *in vitro* citotoksična aktivnost na humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), K562 (hronična mijeloidna leukemija), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-453 (karcinom dojke), LS174 (adenokarcinom kolona) i A549 (karcinom pluća). Pored toga, citotoksičnost ovih jedinjenja ispitana je i na normalnim humanim fibroblastima pluća, MRC-5 [49,53]. Dobile IC₅₀ vrednosti za odabrana jedinjenja čije su strukture prikazane na **Shemi 9** nalaze se u **Tabeli 1**.



Shema 9. Strukture novih jedinjenja koja su ispoljila najbolju citotoksičnost na ispitivanim malignim ćelijskim linijama [49,53]

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)						
	HeLa	K562	MDA-MB-361	MDA-MB-453	LS174	A549	MRC-5
1a	18,1 ± 3,3	11,3 ± 2,2	144,1 ± 36,6	44,4 ± 2,9	61,3 ± 13,0	10,3 ± 0,7	7,7 ± 1,1
1b	7,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2	20,7 ± 6,0	6,8 ± 0,2	35,2 ± 11,6	8,9 ± 0,5	6,5 ± 0,1
1c	17,3 ± 6,8	6,7 ± 0,3	18,7 ± 8,9	6,9 ± 0,3	26,2 ± 6,0	9,5 ± 0,5	7,2 ± 1,3
2a	7,8 ± 0,3	8,8 ± 1,3	> 200	11,0 ± 1,9	12,6 ± 3,8	20,6 ± 1,3	12,7 ± 2,0
cisplatin	2,1 ± 0,2	5,4 ± 0,3	17,1 ± 1,2	3,6 ± 0,5	17,8 ± 0,6	14,4 ± 0,7	9,2 ± 0,2
3a	8,9 ± 1,9	8,8 ± 1,1	12,7 ± 2,0	23,7 ± 2,7	48,2 ± 4,9	22,3 ± 4,7	62,7 ± 6,2
3b	10,7 ± 2,5	8,7 ± 1,1	25,6 ± 4,6	23,8 ± 1,7	49,7 ± 0,5	49,5 ± 0,6	44,8 ± 7,3
3c	9,5 ± 0,9	8,8 ± 1,2	19,6 ± 2,2	26,2 ± 2,7	51,3 ± 3,2	40,4 ± 7,5	49,9 ± 9,3
4a	13,5 ± 0,1	8,9 ± 1,1	36,0 ± 6,3	30,9 ± 6,2	42,6 ± 6,4	25,3 ± 4,0	58,1 ± 2,6
4b	12,9 ± 2,9	10,5 ± 1,3	30,2 ± 7,3	37,3 ± 2,5	21,8 ± 5,1	27,6 ± 7,2	53,4 ± 9,0
4c	11,2 ± 1,6	9,6 ± 1,7	24,6 ± 0,4	33,5 ± 6,3	47,8 ± 3,9	24,9 ± 0,2	48,8 ± 1,6
cisplatin	5,2 ± 0,5	5,7 ± 0,6	21,5 ± 1,5	6,5 ± 0,5	18,6 ± 2,0	17,4 ± 1,8	13,0 ± 1,7

Tabela 1. *In vitro* citotoksičnost novih steroidnih tiosemikarbazona (**1a–c**) i njihovih derivata, tijadiazolina **2a** i tiazolidin-4-ona (**3a–c**, **4a–c**) [49,53].

3-Tiosemikarbazoni **1b** i **1c** su na K562 ćelije ispoljili citotoksičnost u rangu hemioterapeutika cisplatina koji je služio kao pozitivna kontrola (IC₅₀ < 10 μM). Derivat **1b** ispoljio je dobru citotoksičnost na HeLa ćelije, dok su preostala dva jedinjenja ove serije ispoljila umerenu aktivnost. Na MDA-MB-361 ćelije dva tiosemikarbazona su ispoljila citotoksičnost u rangu cisplatina. Kada su u pitanju ćelije MDA-MB-453, na njima su dva derivata ovog tipa ispoljila citotoksičnost nižu od 10 μM, ali su bila duplo manje citotoksična od cisplatina. Slabu citotoksičnu aktivnost tiosemikarbazoni su ispoljili na ćelijama LS174. Tiosemikarbazoni su bili izuzetno citotoksični na ćelije A549, jače od cisplatina, ali su bili još jače citotoksični na normalne humane fibroblasti pluća MRC-5 što znači da izostaje selektivnost za maligne u odnosu na zdrave ćelije. Ipak, i cisplatin, hemioterapeutik koji se decenijama koristi za lečenje mnogih tipova malignih tumora, uključujući i karcinom pluća, bio je jednako neselektivan za A549 ćelije u odnosu na MRC-5 ćelije.

3,17-Bis(tijadiazolin) **2a** se pokazao kao citotoksičan za K562, HeLa i MDA-MB-453 ćelije dok za drugu ćelijsku liniju raka dojke, MDA-MB-361, nije bio citotoksičan. Na ćelije LS174 pomenuti tijadiazolin je bio citotoksičan jače od cisplatina. Dobra citotoksičnost na ćelije A549 ostaje u senci činjenice da je jedinjenje **2a** još jače citotoksično za normalne ćelije MRC-5.

3-Tiazolidin-4-oni su na K562 i HeLa ćelije ispoljili citotoksičnost sa IC₅₀ vrednostima od oko 10 μM. Derivati **3a** i **3c** su na ćelije MDA-MB-361 ispoljili citotoksičnu aktivnost bolju od cisplatina, a **3b** u rangu cisplatina. Na preostale testirane maligne ćelijske linije, MDA-MB-453, LS174 i A549, tiazolidinoni su ispoljili umerenu, slabu, odnosno slabu do umerenu citotoksičnost, redom.

3,17-Bis(tiazolidin-4-oni) su bili citotoksični na HeLa i K562 ćelije dok su na ostale ćelije bili umereno aktivni. Umerena citotoksičnost utvrđena je i za A549 ćelije, ali je bila duplo jača na maligne u odnosu na zdrave humane MRC-5 ćelije.

Ukupno uzevši, K562 i HeLa ćelije su bile najosetljivije na citotoksičnost novih derivata steroidnih hidrazona zbog čega je ispitivanje mehanizama citotoksičnog delovanja istih rađeno upravo na tim ćelijama.

Sumiranjem prikazanih rezultata može da se dođe do zaključka da su α,β-nezasićeni supstituenti u C-3 položaju tiosemikarbazona ili tiazolidin-4-ona, spiro-heterociklični prsten ili okso-grupa u položaju C-17 i tiazolidinonski prsten u poziciji C-17 strukturni fragmenti koji su u najvećoj meri odgovorni za citotoksičnu aktivnost novosintetisanih steroidnih hidrazona i njihovih derivata.

3.2. Ispitivanje citotoksičnosti na PBMC

Derivati steroidnih hidrazona koji su ispoljili najviši intenzitet citotoksične aktivnosti na ispitivanim malignim ćelijskim linijama odabrani su za dalja ispitivanja citotoksičnosti na normalnim humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (*eng. Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), pri čemu je kao pozitivna kontrola korišćen hemioterapeutik cisplatin (**Tabela 2**). Na osnovu ovih rezultata tiosemikarbazoni (serija **1**), nasuprot preostalim testiranim jedinjenjima, ispoljavaju umerenu do dobru citotoksičnost na PBMC.

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)		Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)	
	PBMC ^a			PBMC ^a	
1a	44,1 ± 13,7		3a	145,8 ± 2,5	
1b	15,7 ± 3,0		3b	>200	
1c	24,9 ± 14,8		3c	123,4 ± 4,4	
2a	>200		4a	188,8 ± 15,9	
/	/		4b	87,1 ± 0,5	
/	/		4c	>200	
Cisplatin	60,8 ± 12,6		Cisplatin	71,3 ± 8,20	

^aIz četiri nezavisna eksperimenta (zdravi donori krvi)

Tabela 2. *In vitro* citotoksičnost prema PBMC za najaktivnije tiosemikarbazone (**1a–c**), tijadiazolin **2a** i tiazolidin-4-one (**3a–c**, **4a–c**) [49,53].

Jasnije značenje rezultata ovog eksperimenta dobija se uvidom u izračunate koeficijente selektivnosti (Ks), odnose IC₅₀ vrednosti dobijenih za normalne PBMC i maligne ćelijske linije, što je prikazano u **Tabelama 3 i 4**.

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC/ HeLa	PBMC/ K562	PBMC/ MDA-MB-361	PBMC/ MDA-MB-453	PBMC/ LS174	PBMC/ A549
1a	2,4	3,9	0,3	1,0	0,7	4,3
1b	2,1	2,4	0,8	2,3	0,5	1,8
1c	1,4	3,7	1,3	3,6	1,0	2,6
2a	>25,5	>22,8	> 1	>18,1	> 15,9	> 9,7
Cisplatin	28,9	11,3	3,6	16,9	3,4	4,2

Tabela 3. Koeficijent selektivnosti (Ks) u citotoksičnom dejstvu mono-tiosemikarbazona **1a–c** i bis(tijadiazolina) **2a** u odnosu na PBMC [49].

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC/ HeLa	PBMC/ K562	PBMC/ MDA-MB-361	PBMC/ MDA-MB-453	PBMC/ LS174	PBMC/ A549
3a	16,3	16,6	11,5	6,2	3	6,5
3b	> 18,6	> 23	> 7,8	> 8,4	> 4	> 4,0
3c	13	14	6,3	4,7	2,4	3,1
4a	14	21,3	5,2	6,1	4,4	7,5
4b	6,7	8,3	2,9	2,3	4,0	3,2
4c	> 17,8	> 20,8	> 8,1	> 6	> 4,2	> 8,0
Cisplatin	13,6	12,6	3,3	11,1	3,8	4,1

Tabela 4. Koeficijent selektivnosti (Ks) u citotoksičnom dejstvu odabranih tiazolidin-4-ona, jedinjenja **3a–c** i **4a–c** u odnosu na PBMC [53]

Naime, smatra se da ukoliko su vrednosti koeficijenata selektivnosti iznad 2,5 jedinjenja za koja su isti dobijeni svrstavaju se u grupu onih jedinjenja koja imaju potencijal da se, u cilju dalje procene njihove antitumorske efikasnosti, ispituju *in vivo*.

Tiosemikarbazoni (serija **1**, **Tabela 3**) [49] su pokazali višu citotoksičnost na HeLa, K562, MDA-MB-453 i A549 ćelije u odnosu na normalne PBMC, dok za LS174 ćelije to ne važi. Jedinjenje **1a** je za K562 i A549 ćelije imalo Ks vrednosti iznad 2,5, dok je za jedinjenje **1c** to važilo i za MDA-MB-453 ćelije.

Ks dobijeni za najbolji od testiranih bis(tijadiazolina), jedinjenje **2a**, ukazuju na višu citotoksičnu aktivnost na sve ispitane maligne ćelijske linije u odnosu na normalne PBMC. Ks ovog derivata su za sve ćelijske linije osim za MDA-MB-361 veći od 2,5 i imaju najviše vrednosti od svih novih derivata, tačnije kreću se u intervalu 9,7–25,5, što ovo jedinjenje ubraja u grupu potencijalnih kandidata za *in vivo* ispitivanja antikancerske aktivnosti.

Kada su u pitanju tiazolidin-4-oni (**Tabela 4**) [53], sva ispitivana jedinjenja ispoljila su viši intenzitet citotoksične aktivnosti na sve maligne ćelijske linije, naročito na HeLa, K562, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, u odnosu na PBMC. Selektivnost pri antikancerskoj aktivnosti tiazolidin-4-ona bila je veoma visoka, u velikom broju slučajeva bolja nego za cisplatin, pri čemu su HeLa i K562 ćelijske linije bile najosetljivije na citotoksične efekte ove klase jedinjenja. Pored toga, jedinjenja **3a**, **3b**, **4a** i **4c** su takođe ispoljila vrlo dobru selektivnost pri antikancerском delovanju na humane ćelijske linije kancera dojke, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, kao i na ćelije karcinoma pluća A549.

Efikasno i selektivno ubijanje malignih ćelija uz ispoljavanje minimalne toksičnosti na normalne ne-transformisane ćelije, a naročito na ćelije imunskog sistema koje učestvuju u antikancerском imunskom odgovoru, izuzetno su važna svojstva pri razvoju novih antikancerских lekova. Stoga, vrlo dobra selektivnost pri citotoksičnom delovanju ispitivanih derivata steroidnih hidrazona za humane maligne ćelijske linije (posebno za K562 i HeLa ćelije) u poređenju sa normalnim humanim PBMC, ukazuje na značajan antikancerški potencijal ovih jedinjenja, koji bi trebalo dalje da se ispituje *in vivo*.

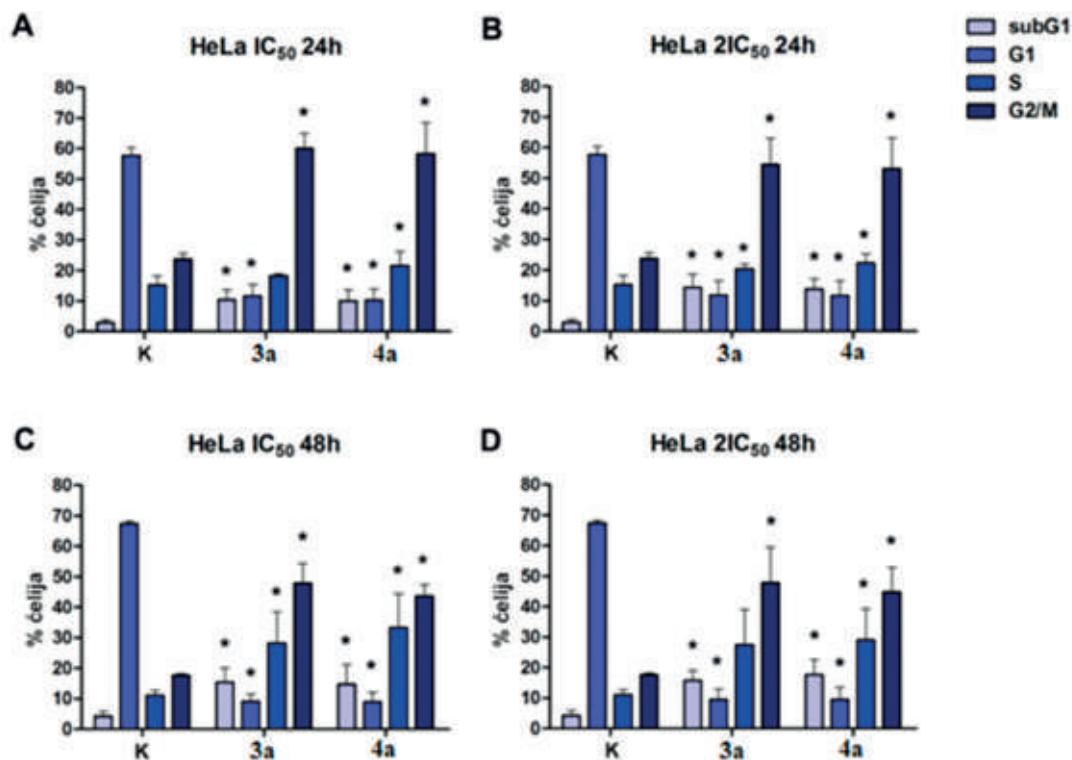
3.3. Promene u distribuciji HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

S ciljem da se rasvetle mehanizmi citotoksičnog delovanja novih steroidnih derivata ispitivane su promene u raspodeli HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nastale kao posledica tretiranja ćelija IC_{50} i dvostrukim IC_{50} koncentracijama jedinjenja **3a** i **4a** u trajanju od 24 i 48 h [53].

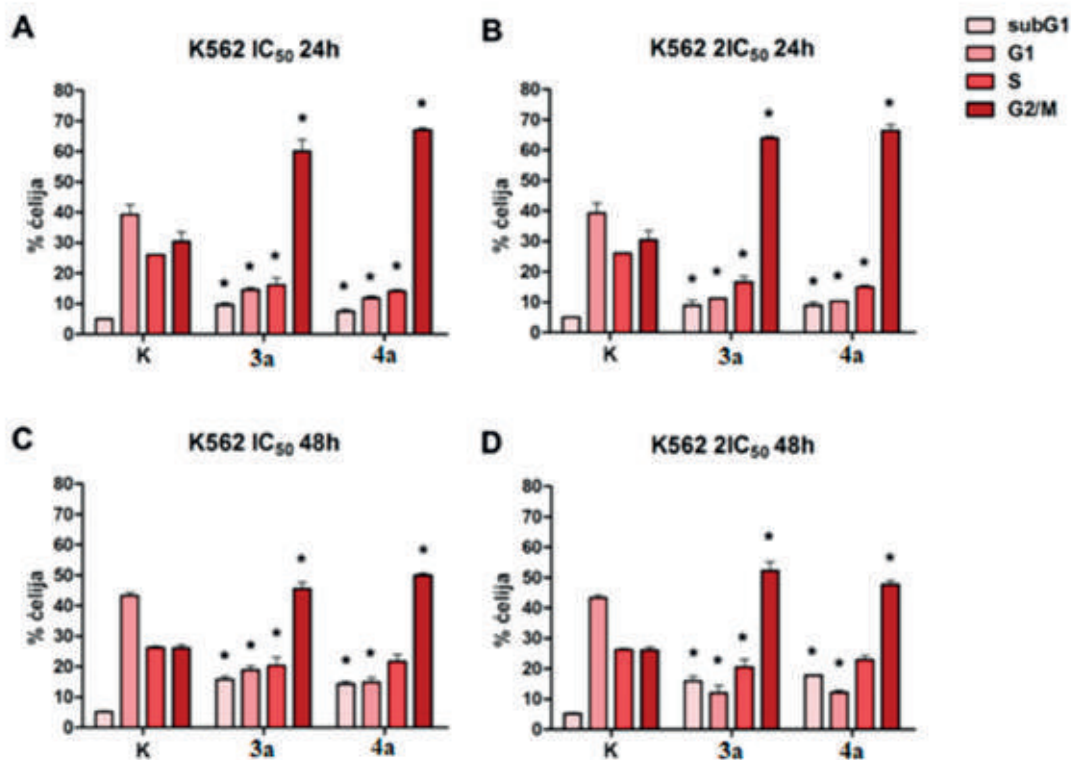
Oba ispitana derivata steroidnih hidrazona, bilo da su primenjeni u IC_{50} ili $2IC_{50}$ koncentracijama pri periodu inkubiranja od 24 ili 48 h, dovela su do promena u distribuciji HeLa i K562 ćelija po određenim fazama ćelijskog ciklusa.

Tiazolidin-4-oni **3a** i **4a** primenjeni pri IC_{50} i dvostrukim IC_{50} koncentracijama u trajanju od 24 h ili 48 h indukovali su statistički značajno povećanje procenta HeLa ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim uzorkom ćelija (**Slika 1**). Ove promene su praćene značajnim smanjenjem procenta tretiranih HeLa ćelija u G1 fazi. Pored toga, izloženost jedinjenju **3a** $2IC_{50}$ koncentraciji u trajanju od 24 h i IC_{50} koncentraciji u trajanju od 48 h dovela je do značajne akumulacije HeLa ćelija u S fazi, dok je statistički značajno povećanje procenta ćelija u S fazi primećeno u HeLa ćelijama tretiranim sa obe koncentracije jedinjenja **4a** u trajanju od 24 h ili 48 h.

U ćelijama humane mijeloidne leukemije K562 tretman IC_{50} i $2IC_{50}$ koncentracijama mono-tiazolidin-4-ona **3a** u trajanju od 24 h i 48 h prouzrokovao je statistički značajno povećanje procenta ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, kao i značajno povećanje u G2/M fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim ćelijama (**Slika 2**). Takođe je evidentirano i značajno smanjenje procenta K562 ćelija u fazama G1 i S. Bis(tiazolidin-4-on) **4a** u obe primenjene koncentracije doveo je do značajne akumulacije K562 ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Pored toga, primećen je i statistički značajan pad procenta K562 ćelija u G1 fazi, dok je redukovan broj ćelija u S fazi bio statistički značajan samo ukoliko je tretman trajao 24 h.



Slika 1. Promene u distribuciji HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Analiza ćelijskog ciklusa je vršena na HeLa ćelijama koje su bile tretirane IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** [53] u trajanju od 24 ili 48 h. Rezultati eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Za statističku obradu podataka je korišćen program ANOVA pri čemu su statistički značajne vrednosti ($p < 0,05$) označene zvezdicom (*).



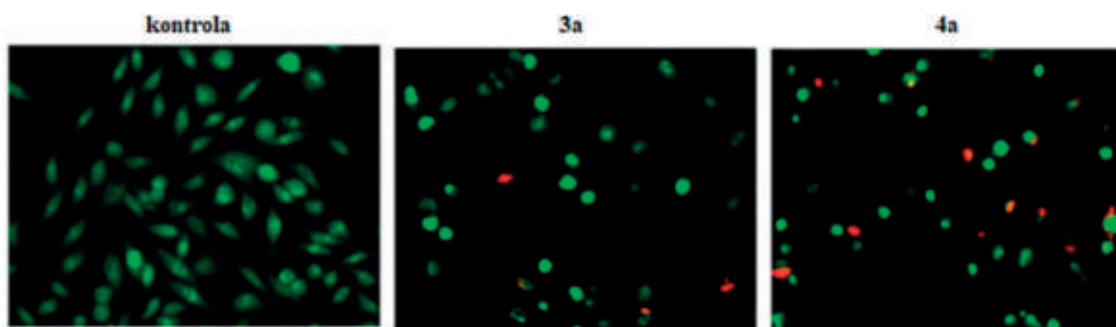
Slika 2. Promene u distribuciji K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Analiza ćelijskog ciklusa je vršena na K562 ćelijama tretiranim IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** [53] u trajanju od 24 ili 48 h. Rezultati eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Program ANOVA je korišćen za statističku obradu podataka pri čemu su statistički značajne vrednosti ($p < 0,05$)

3.4. Detekcija tipa ćelijske smrti HeLa ćelija

3.4.1. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti fluorescentnom mikroskopijom

Tip ćelijske smrti koju indukuju jedinjenja **3a** i **4a** na HeLa ćelijama ispitan je morfološkom analizom fluorescentnom mikroskopijom ciljnih ćelija obojenih smešom boja akridin-oranž i etidijum-bromid (**Slika 3**). Kao pozitivna kontrola korišćen je hemioterapeutik cisplatin [53].

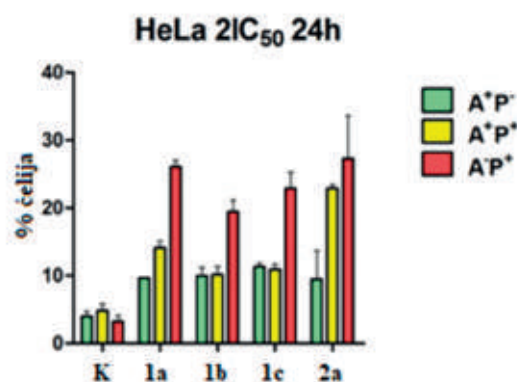
Na fotomikrografijama HeLa ćelija koje su bile tretirane $2IC_{50}$ koncentracijama (određene MTT testom nakon 72 h delovanja) steroidnih jedinjenja u trajanju od 24 h mogla su da se uoče tipična morfološka obeležja apoptoze - skupljanje ćelija, kondenzacija hromatina, smanjivanje i fragmentacija nukleusa, prisustvo narandžasto-crvenoobojenih ćelija u kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze. Kružni oblik HeLa ćelija koji je zapažen pri tretmanu jedinjenjima **3a** i **4a** jednim delom je uzrokovan i zaustavljanjem u G2/M fazi ćelijskog ciklusa o čemu svedoči eksperiment analize ćelijskog ciklusa.



Slika 3. Indukovanje apoptoze HeLa ćelija tiazolidin-4-onima **3a** i **4a** [53].

3.4.2. Detekcija tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom

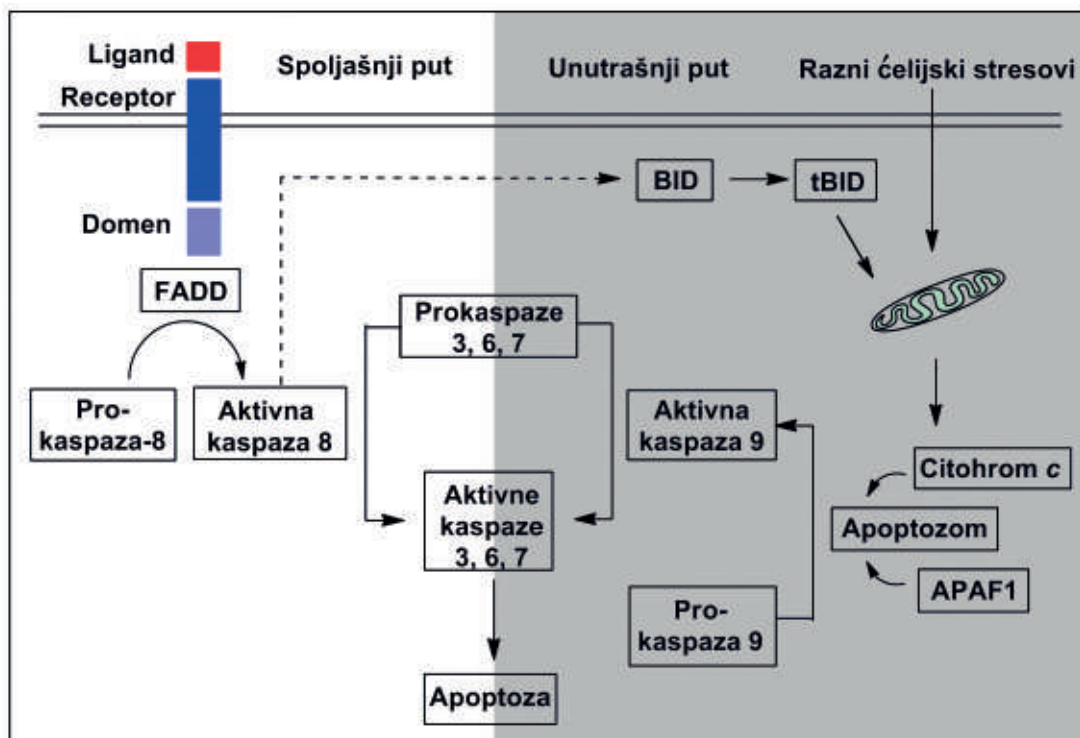
Identifikacija HeLa ćelija u različitim stadijumima apoptoze indukovane ispitivanim steroidnim derivatima urađena je protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija smešom boja aneksin V-FITC (A) i propidijum-jodid (P) [49]. Frakcija živih ćelija (A^-/P^-) koja nije prikazana na **Slici 4** najzastupljenija je u netretiranim kontrolnim ćelijama. Tretman HeLa ćelija $2IC_{50}$ koncentracijama ovih steroidnih derivata je doveo do povećanja procenta ćelija u ranoj fazi apoptoze (A^+/P^-), ćelija u kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze, (A^+/P^+), kao i mrtvih ćelija (A^-/P^+). Dakle, ovaj eksperiment je pokazao da nosintetisana jedinjenja prouzrokuju apoptozu HeLa ćelija.



Slika 4. Analiza protočnom citometrijom kontrolnih i tretiranih HeLa ćelija obojenih aneksin V FITC-om i propidijum-jodidom. HeLa ćelije su bile tretirane $2IC_{50}$ koncentracijama steroidnih tiosemikarbazona **1a-c** i tizadiazolina **2a** u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.D. dva nezavisna eksperimenta [49].

3.5. Određivanje ciljnih kaspaza

Kaspaze, aspartat-specifične cistein-proteaze, izuzetno su značajni učesnici signalnih puteva apoptoze. Proizvode se u obliku neaktivnih monomernih prokaspaza koje zahtevaju dimerizaciju i razlaganje za aktivaciju. Od apoptotskih kaspaza -3, -8 i -9, kaspaze -8 i -9 su inicijatorske, dok je kaspaza-3 jedna od glavnih egzekutorskih (efektorskih) kaspaza. Kaspaza-8 je učesnik spoljašnjeg puta apoptoze kojeg pokreću ligandi koji se vezuju za receptore smrti. Kao posledica raznih ćelijskih stresova mitohondrije otpuštaju citohrom c, formira se apoptozom i na taj način se pokreće unutrašnji ili mitohondrijski put apoptoze posredstvom kaspaze-9 (**Slika 5**) [54,55].

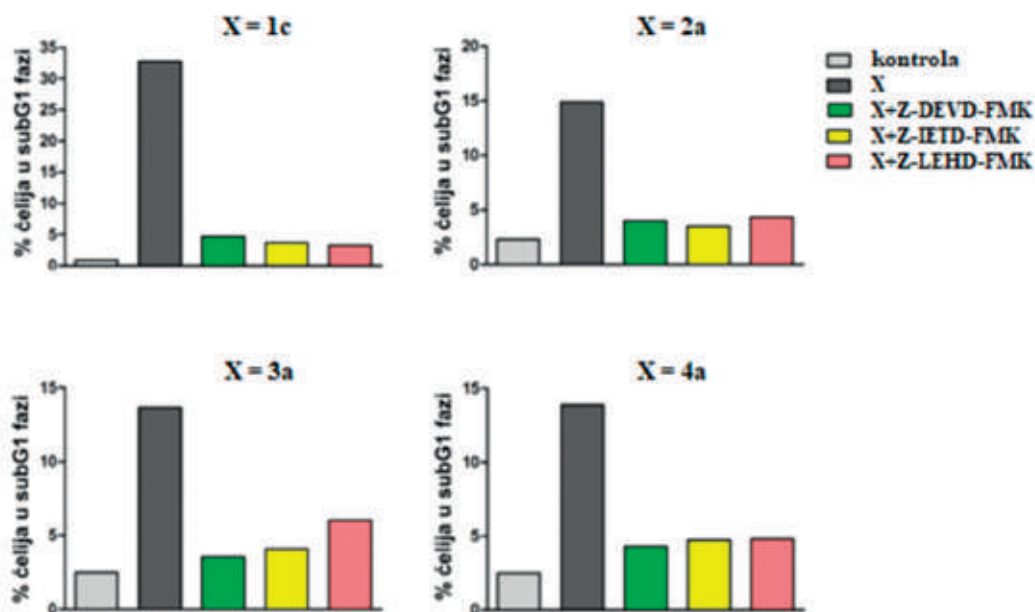


FADD – domen smrti povezan sa ligandom Fas; APAF1 – apoptotski proteazno aktivirajući faktor 1;
 BID – proapoptotski Bcl-2 protein koji sadrži samo BH₃ domen; tBID – kaspazom-8 aktivirani BID

Slika 5. Spoljašnji i unutrašnji put apoptoze

Odgovor na pitanje koje od apoptotskih kaspaza-3, -8 i -9 učestvuju u indukciji apoptoze HeLa ćelija izloženih dejstvu sintetisanih derivata steroidnih hidrazona dobijen je upotrebom specifičnih inhibitora tih kaspaza, fluormetil-ketoni derivatizovanih peptida, Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9) pri čemu je meren procenat HeLa ćelija u subG1 fazi, odnosno procenat apoptotskih ćelija (**Slika 6**).

Za svako od ispitivanih steroidnih jedinjenja pokazano je značajno smanjenje procenta HeLa ćelija u subG1 fazi u uzorcima koji su prvo tretirani specifičnim inhibitorom kaspaze-3, -8 ili -9, a zatim tretirani 2IC₅₀ koncentracijom jedinjenja, u odnosu na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi u uzorcima koji su tretirani samo jedinjenjem. Dakle, upotrebom bilo kojeg od tri korišćena inhibitora kaspaza povećano je preživljavanje HeLa ćelija što je dokaz da su ispitivana jedinjenja sposobna da posredstvom kaspaza aktiviraju kako spoljašnji tako i unutrašnji put apoptoze.



Slika 6. Određivanje ciljnih kaspaza, učesnika u signalnim putevima apoptoze, indukovano najaktivnijim derivatima steroidnih hidrazona. Efekat primene specifičnih inhibitora kaspaza (Z-DEVD-FMK – inhibitor kaspaze-3; Z-IETD-FMK – inhibitor kaspaze-8; Z-LEHD-FMK – inhibitor kaspaze-9) na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja 2IC50 koncentracijama novih derivata [49, 53].

3.6. *In vitro* test za angiogenezu ili test građenja cevi od endotelnih ćelija

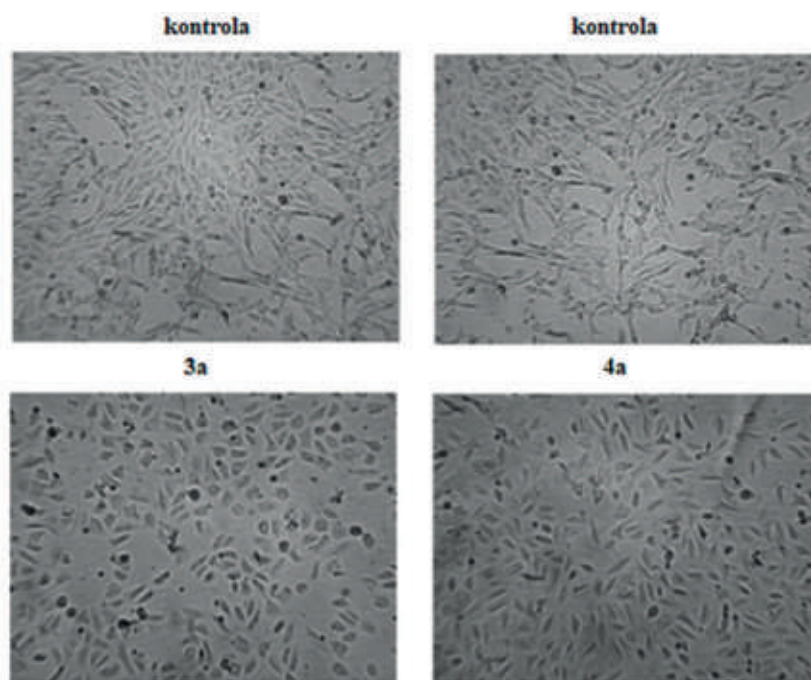
Kako bi maligna ćelija neometano dopremila nutrijente i kiseonik potrebne za opstanak ona teži da proširi i razgrana mrežu krvnih sudova odnosno započinje proces angiogeneze. Novonastali krvni sudovi su strukturno neorganizovani, prošireni i propustljivi tako da povećavaju verovatnoću metastaziranja tumora. Pored toga, luče materije koje sprečavaju proces apoptoze. Stoga je jedna od strategija borbe protiv malignih tumora upravo inhibiranje procesa angiogeneze. Inhibitori angiogeneze su manje toksični od standardno korišćenih hemioterapeutika i koriste se paralelno uz operaciju, hemioterapiju ili zračenje [1].

Kada se humane endotelne ćelije pupčane vene, EA.hy926 ćelije, zaseju na površinu matriksnog matrigela one počinju da se šire, povezuju i reorganizuju tako da formiraju tubularne strukture nalik na kapilare i poligonalne strukture [56]. Ovaj esej primenjuje se za ispitivanje sposobnosti jedinjenja da inhibira proces angiogeneze *in vitro* odnosno za ispitivanje antiangiogenetskog potencijala jedinjenja.

Reprezentativne fotomikrografije kontrolnih EA.hy926 ćelija i ćelija izloženih dvadesetočasovnom delovanju suptoksičnih IC₂₀ koncentracija novih najaktivnijih i najselektivnijih steroidnih derivata, tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** [53], prikazane su na **Slici 7**.

Svi ispitivani derivati su pokazali sposobnost da inhibiraju angiogenezu EA.hy926 ćelija *in vitro*.

In vitro esej angiogeneze ukazao je na antiangiogenetske efekte tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** primenjenih pri niskim suptoksičnim koncentracijama. Oba tiazolidin-4-ona inhibirala su širenje i povezivanje EA.hy926 ćelija kao i formiranje tubularnih struktura što svedoči o njihovom antiangiogenetskom potencijalu.



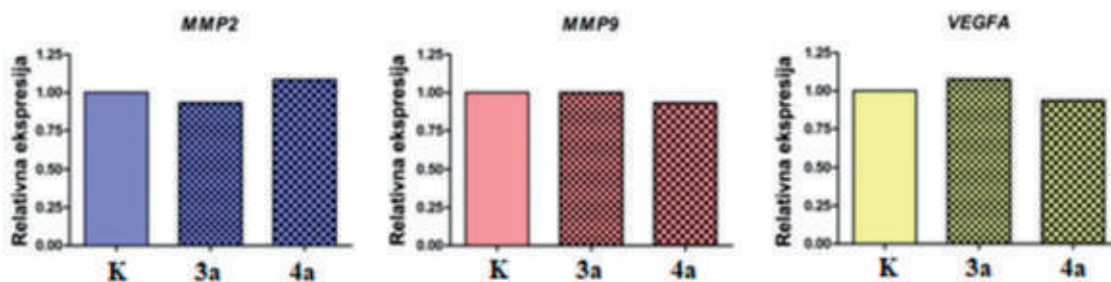
Slika 7. Efekti derivata steroidnih hidrazona na *in vitro* angiogenezu EA.hy926 ćelija. Fotomikrografije kontrolnih EA.hy926 ćelija i ćelija izloženih suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** u trajanju od 20 h.

3.7. Efekat steroidnih derivata na ekspresiju gena u HeLa ćelijama

Matriksne metaloproteinaze (MMP) su familija cink-zavisnih proteinaza čiji su predstavnici MMP-2 i MMP-9. Ovi proteini se aktiviraju hidrolizom. Geni *MMP-2* i *MMP-9* kodiraju enzime koji vrše degradaciju kolagena tipa IV, glavne strukturne komponente bazalne membrane, i samim tim utiču na svojstva bazalne membrane da ometa pokretljivost malignih ćelija. Istraživanja su pokazala da MMP-2 i MMP-9 igraju ključnu ulogu u degradaciji ekstracelularnog matriksa kao i u promovisanju invazije tumora i metastaziranja [57].

Kako bi maligna ćelija obezbedila kiseonik i nutrijente neophodne za opstanak i rast, ona formira mrežu kapilara iz postojećih krvnih sudova odnosno aktivira proces angiogeneze. *VEGFA* je gen koji kodira protein vaskularnog endotelnog faktora rasta A. Spada u najmoćnije specifične angiogene faktore, a aktivan je u formi glikozilovanog homodimernog proteina. *VEGFA* inhibira apoptozu i dovodi do proliferacije endotelnih ćelija, njihove migracije, organizovanja u tubule i povećanja permeabilnosti što su sastavni delovi angiogene kaskade [58].

U cilju istraživanja antimetastatskih i antiangiogenetskih svojstava novih steroidnih tiazolidin-4-onskih derivata **3a** i **4a**, ispitan je njihov uticaj na ekspresiju gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u HeLa ćelijama. Poređen je nivo ekspresije kontrolnih gena kod HeLa ćelija tretiranih steroidnim tiazolidin-4-onima (**Slika 8**). Tretman jedinjenjima **3a** i **4a** jedva da je uticao na nivoe ekspresije gena *MMP2* i *MMP9*. Pored toga, ova jedinjenja nisu uzrokovala značajne izmene ekspresije gena proangiogenog faktora rasta *VEGFA* u HeLa ćelijama. Dakle, ispitivani tiazolidin-4-oni ne podstiču angiogenezu niti povećavaju verovatnoću nastanka metastaza.



Slika 8. Nivo ekspresije gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u kontrolnim HeLa ćelijama (K) i HeLa ćelijama izloženim suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **3a** i **4a** u trajanju od 24 h.

4. ZAKLJUČAK

Derivati steroidnih hidrazona ispoljavaju mnoštvo bioloških efekata, a odlikuje ih snižena toksičnost u odnosu na druge vrste lekova. Iz tog razloga mnoge istraživačke grupe bave se sintezom i ispitivanjem bioloških svojstava ovih jedinjenja.

Za nove derivate utvrđeno je da su strukturni fragmenti koji pozitivno utiču na njihovu antikancersku aktivnost α,β -nezasićena tiosemikarbazonaska strukturna jedinica u položaju C-3, spiro heterociklični supstituent u položaju C-17 bis(tijadiazolina) i heterociklični tiazolidinonski prsten uveden u položaj C-3, a naročito u položaj C-17.

Zahvaljujući njihovom jakom antiproliferativnom i proapoptotskom efektu prema malignim ćelijskim linijama, kao i visokoj selektivnosti u citotoksičnom delovanju na maligne u odnosu na normalne ćelije, rezultati sprovedenih *in vitro* istraživanja mogu da ukažu na značajan antitumorski potencijal steroidnih tiosemikarbazona **1a–c**, tijadiazolina **2a** i tiazolidin-4-ona **3a** i **4a**, što ova jedinjenja ubraja u potencijalne kandidate za *in vivo* ispitivanja.

Na osnovu dobijenih rezultata nameće se zaključak da bi valjalo da se već postojeći derivati steroidnih hidrazona koji su pokazali citotoksični potencijal podvrgnu dodatnim *in vitro* i *in vivo* testovima, kao i da se sintetišu i ispitaju nova jedinjenja ove klase koja bi bila potencijalni budući hemioterapeutici.

5. ZAHVALNICA

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj ugovora 451-03-68/2022-14/200026).

6. LITERATURA

1. Patrick G. An Introduction to Medicinal Chemistry. 5th Edition ed.; OUP Oxford: 2013.
2. Fieser L, Fieser M. *Steroids*. Reinhold Pub.: 1967.
3. <https://www.who.int/cancer/en/>, poslednja poseta 20.05.2022.
4. Wallin K, Wood R. Anabolic–androgenic steroids impair set-shifting and reversal learning in male rats. *European Neuropsychopharmacology* 2015; 25: 583-90.
5. Mohareb R, Al-Omran F. Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: Novel synthesis of hydrazide–hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids* 2012; 77: 1551-59.
6. Frank É, Kovács D, Schneider G, Wölfling J, Bartók T, Zupkó I. Synthesis of novel steroidal 16-spiroisoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro. *Molecular Diversity* 2014; 18: 521-34.
7. Huang Y, Cui J, Zheng Q, Zeng C, Chen Q, Zhou A. 6-Hydroximino-4-aza-A-homo-cholest-3-one and related analogue as a potent inducer of apoptosis in cancer cells. *Steroids* 2012; 77: 829-34.
8. Koutsourea A, Fousteris M, Arsenou E, Papageorgiou A, Pairas G, Nikolaropoulos S. Rational design, synthesis, and in vivo evaluation of the antileukemic activity of six new alkylating steroidal esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; 16: 5207-15.
9. Dhingra N, Bhardwaj T, Mehta N, Mukhopadhyay T, Kumar A, Kumar M. Synthesis, antiproliferative, acute toxicity and assessment of antiandrogenic activities of some newly synthesized steroidal lactams. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45: 2229-36.
10. Krstic N, Bjelakovic M, Zizak Z, Pavlovic M, Juranic Z, Pavlovic V. Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities. *Steroids* 2007; 72: 406-14.
11. Iványi Z, Szabó N, Huber J, Wölfling J, Zupkó I, Szécsi M et al. Synthesis of D-ring-substituted (5'R)- and (5'S)-17 β -pyrazolinylandrosterone epimers and comparison of their potential anticancer activities. *Steroids* 2012; 77: 566-74.
12. Baji Á, Kiss T, Wölfling J, Kovács D, Igaz N, Gopisetty, M et al. Multicomponent access to androstano-arylpyrimidines under microwave conditions and evaluation of their anti-cancer activity in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2017; 172: 79-88.
13. Baji Á, Kovács F, Mótyán G, Schneider G, Wölfling J, Sinka I et al. Investigation of pH and substituent effects on the distribution ratio of novel steroidal ring D- and A-fused arylpyrazole regioisomers and evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro. *Steroids* 2017; 126: 35-49.
14. Krstic N, Bjelakovic M, Dabovic M, Pavlovic V. Thionation of Some α,β -Unsaturated Steroidal Ketones. *Molecules* 2010; 15: 3462-77.
15. Krstic N, Bjelakovic M, Pavlovic V, Robeyns K, Juranic Z, Matić I et al. New androst-4-en-17-spiro-1,3,2-oxathiaphospholanes. Synthesis, assignment of absolute configuration and in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *Steroids* 2012; 77: 558-65.
16. Krstic N, Pavlovic V, Novakovic I, Matic I, Sladic D. Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel P-heterocyclic androst-4-ene derivatives. *Molecular Diversity* 2013; 17: 547-61.
17. Krstic N, Matic I, Juranic Z, Novakovic I, Sladic D. Steroid dimers - In vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2014; 143: 365-75.
18. Mohareb R, Wardakhan W, Elmegeed G, Ashour R. Heterocyclizations of pregnenolone: Novel synthesis of thiosemicarbazone, thiophene, thiazole, thieno[2,3-b]pyridine derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids* 2012; 77: 1560-69.
19. Verma G, Marella A, Shaquiquzzaman M, Akhtar M, Ali M, Alam M. A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 2014; 6: 69-80.
20. Ergenç N, Günay N, Demirdamar R. Synthesis and antidepressant evaluation of new 3-phenyl-5-sulfonamidoindole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1998; 33: 143-48.
21. Khan S, Asiri A. Novel Steroidal (6R)-Spiro-1,3,4-thiadiazoline Derivatives as Anti-bacterial Agents. *Chinese Journal of Chemistry* 2012; 30: 1901-05.
22. Singh S, Athar F, Maurya M, Azam A. Cyclooctadiene Ru(II) complexes of thiophene-2-carboxaldehyde-derived thiosemicarbazones: synthesis, characterization and antimicrobial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 41: 592-98.

23. Bermejo E, Carballo R, Castineiras A,; Dominguez R, Liberta A, Maichle-Mössmer C et al. Complexes of Group 12 Metals with 2-Acetylpyridine 4N-Dimethylthiosemicarbazone and with 2-Acetylpyridine-N-oxide 4N-Dimethylthiosemicarbazone: Synthesis, Structure and Antifungal Activity. *Zeitschrift für Naturforschung B* 1999; 54: 777-87.
24. Verma K, Pandeya S, Singh U, Gupta S, Sharma P, Chaudhary A et al. Synthesis and Pharmacological Activity of Some Substituted Menthone Semicarbazone and Thiosemicarbazone Derivatives. *International journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2009; 1: 357-62.
25. Jabeen M, Choudhry M, Miana G, Rahman K, Rashid U, Khan H et al. Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of progesterone and testosterone derivatives as anticancer agents. *Steroids* 2018; 136: 22-31.
26. Cui J, Liu L, Zhao D, Gan C, Huang X, Xiao Q et al. Synthesis, characterization and antitumor activities of some steroidal derivatives with side chain of 17-hydrazone aromatic heterocycle. *Steroids* 2015; 95: 32-38.
27. Nadaraia N. Synthesis and Biological Activity of Steroidal Tigogenin Hydrazones and Pyrazolines. *Chemistry of Natural Compounds* 2018; 54: 926-29.
28. Benmohammed A, Khoumeri O, Djafri A, Terme T, Vanelle P. Synthesis of Novel Highly Functionalized 4-Thiazolidinone Derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones. *Molecules* 2014; 19: 3068-83.
29. Pérez J, Matesanz A, Martín-Ambite A, Navarro P, Alonso C, Souza P. Synthesis and characterization of complexes of p-isopropyl benzaldehyde and methyl 2-pyridyl ketone thiosemicarbazones with Zn(II) and Cd(II) metallic centers. Cytotoxic activity and induction of apoptosis in Pam-ras cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1999; 75: 255-61.
30. Krishna P, Shankara B, Reddy N. Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Binuclear Copper(II) Complexes of (2E)-2-(2-Hydroxy-3-Methoxybenzylidene)-4N-Substituted Hydrazinocarbothioamides. *International Journal of Inorganic Chemistry* 2013; 2013: 1-11.
31. Liberta A, West D. Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. *Biometals* 1992; 5: 121-26.
32. West D, Liberta A, Padhye S, Chikate R, Sonawane P, Kumbhar A et al. Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. *Coordination Chemistry Reviews* 1993; 123: 49-71.
33. Yusuf M, Jain P. Synthesis and biological significances of 1,3,4-thiadiazolines and related heterocyclic compounds. *Arabian Journal of Chemistry* 2014; 7: 525-52.
34. Hall I, Chen S, Jo Barnes B, West D. The Hypolipidemic Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones, Thioureas and Their Metal Complexes in Sprague Dawley Male Rats. *Metal-Based Drugs* 1999; 6: 143-47.
35. Brousse B, Moglioni A, Martins Alho M, Álvarez-Larena Á, Moltrasio G, D'Accorsob N. Behavior of thiosemicarbazones derived from some terpenones under acetylating conditions. *ARKIVOC: Archive for Organic Chemistry* 2002; 2002: 14-23.
36. Kelly P, Slawin A, Soriano-Rama A. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* 1996; 53-59.
37. West D, Pardhye S, Sonawane P. Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbazate complexes. In *Complex Chemistry* 1991; 76: 1-50.
38. Ostrovskaya R, Voronina T. Antagonistic effect of bicuculline and thiosemicarbazide on the tranquilizing action of diazepam. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1977; 83: 332-34.
39. Voronina T, Tozhanova N. Effect of stimulants on tranquilizing, hypnotic and myorelaxant effects of phenazepam. *Farmakologiya i Toksikologiya (Moscow)* 1981; 44: 155-59.
40. Swathi K, Sarangapani M. Synthesis and sedativehypnotic activity of novel series of isatin hydrazone and isatin thiosemicarbazone derivatives. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014; 3: 2720-29.
41. Pandeya S, Mishra V. Analgesic activity and hypnotic effect of (\pm)-3-mentone semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *Acta Pharmaceutica* 2001; 51: 183-88.
42. Khan S, Kumar P, Joshi R, Iqbal P, Saleem K. Synthesis and in vitro antibacterial activity of new steroidal thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 43: 2029-34.
43. Asif M, Husain A. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. *Journal of Applied Chemistry* 2013; 2013: 1-7.
44. Lessa J, Mendes I, da Silva P, Soares M, dos Santos R, Speziali N et al. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45: 5671-77.

45. Adsule S, Banerjee S, Ahmed F, Padhye S, Sarkar F. Hybrid anticancer agents: isothiocyanate-progesterone conjugates as chemotherapeutic agents and insights into their cytotoxicities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20: 1247-51.
46. Huang Y, Cui J, Chen S, Lin Q, Song H, Gan C et al. Synthesis and Evaluation of Some New Aza-B-homocholestane Derivatives as Anticancer Agents. *Marine Drugs* 2014; 12: 1715-31.
47. Cui J, Lin Q, Huang Y, Gan C, Yao Q, Xiao Q et al. Design, synthesis and antiproliferative evaluation of some B-homo steroidal lactams. *Medicinal Chemistry Research* 2015; 24: 2906-15.
48. Gan C, Cui J, Su S, Lin Q, Jia L, Fan L et al. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. *Steroids* 2014; 87: 99-107.
49. Zivkovic M, Matic I, Rodic M, Novakovic I, Sladic D, Krstic N. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic activities of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines. *RSC Advances* 2016; 6: 34312-33.
50. Zivkovic M, Novakovic I, Matic I, Sladic D, Krstic N. Synthesis and preliminary screening for the biological activity of some steroidal Δ^4 -unsaturated semicarbazone derivatives. *Steroids* 2019; 148: 36-46.
51. Khan S, Asiri A. Synthesis and In Vitro Antibacterial Activity of Novel Steroidal (6R)-Spiro-1,3,4-thiadiazoline Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2012; 49: 1452-57.
52. Jain A, Vaidya A, Ravichandran V, Kashaw S, Agrawal R. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012; 20: 3378-95.
53. Zivkovic M, Matic I, Rodic M, Novakovic I, Krivokuca A, Sladic D et al. Anticancer potential of new steroidal thiazolidin-4-one derivatives. Mechanisms of cytotoxic action and effects on angiogenesis in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2017; 174: 72-85.
54. Vilipic J. Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i tert-butihinona i ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2017.
55. McIlwain D, Berger T, Mak T. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013; 5: a008656.
56. Aranda E, Owen G. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biological Research* 2009; 42: 377-89.
57. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52-67.
58. Mueller M, Vigne J, Minchenko A, Lebovic D, Leitman D, Taylor R. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 10972-77.



IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2022.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Urednik

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Uređivački odbor

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

Godišnje

Tiraž

100 primeraka

Autori

Aleksandar Cingel.....	238
Ana Branković.....	63
Ana Djordjević.....	63
Branislava Medić Brkić.....	15
Dragana Srebro.....	15
Dunja Drakulić.....	168
Dusan Keckarević.....	51, 275
Goran Brajušković.....	63
Gordana Matić.....	8
Ilona Đorić.....	75
Ivana Guševac Stojanović.....	168
Jelena Martinović.....	186
Jelena Perić.....	143
Jovana Despotović.....	90
Katarina Savić Vujović.....	15
Katarina Zeljić.....	223
Mariana Stanišić.....	255
Marijana B. Živković.....	104
Marina Zarić Kontić.....	186
Milena Trajković.....	238
Milena Ugrin.....	32
Milica Keckarević Marković.....	51, 275
Milica Popović.....	63
Miljana Kecmanović.....	51, 275
Neda Đorđević.....	206
Nevena Banjac.....	223
Nikola Jovanović.....	125
Predrag Vujović.....	155
Sladjana Jevremović.....	238
Slavica Ninković.....	223
Sonja Šelemetjev.....	75
Sonja Vučković.....	15
Suzana Matijašević-Joković.....	63
Tamara Dakić.....	155
Tatjana Mitrović.....	125
Tijana Išić Denčić.....	75
Zorana Dobrijević.....	63

CIP - Каталогизacija u publikaciji
Nародна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2022, br. 2 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929