UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija Z. Ostojić

Ekspresija nišarina u metastatskom melanomu i antitumorski potencijal njegovih agonista *in vitro*

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija Z. Ostojić

Nischarin expression in metastatic melanoma and antitumor potential of its agonists *in vitro*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori: dr Jelena Grahovac, viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

dr Aleksandra Korać, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Beograd

Članovi komisije: dr Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

dr Aleksandra Čvoro, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Ana Đurić, viši naučni saradnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Datum odbrane: _____

Ekspresija nišarina u metastatskom melanomu i antitumorski potencijal njegovih agonista *in vitro*

Sažetak

Zbog razvoja rezistencije na prethodno efikasne terapije, postoji stalna potreba za novim terapijskim pristupima u lečenju metastatskog melanoma. Nišarin (NISCH) je multifunkcijski protein sa opisanom tumor-supresorskom ulogom, a smatra se i funkcionom komponentom imidazolinskog I_1-receptorskog sistema. Cilj ove disertacije bio je da se ispita nivo, regulacija i klinički značaj NISCH u melanomu, kao i antitumorski potencijal agonista imidazolinskih I_1-receptora. Analizom javno dostupnih baza podataka i uzoraka pacijenata pokazano je da je ekspresija NISCH smanjena u tkivima melanoma u odnosu na normalnu kožu i nevuse, čemu doprinosi prisustvo mikrodelecija i hipermetilacije promotora *NISCH* gena. Uočena je i nukleusna lokalizacija NISCH, koja nije ranije opisana. Ekspresija *NISCH* u primarnom melanomu je imala povoljan prognostički značaj kod žena, dok je, neočekivano, viša ekspresija *NISCH* kod muškaraca bila povezana sa lošijom prognozom. Od ispitivanih agonista rilmenidin je pokazao najizraženije antiproliferativno dejstvo i selektivnost za ćelijske linije melanoma. Rilmenidin je narušavao formiranje tumorskih sferoida, menjao raspodelu ćelija u ćelijskom ciklusu, indukovao apoptozu, smanjivao adheziju i migraciju i različito uticao na invaziju u zavisnosti od tipa ekstracelularnog matriksa. Transkriptomske analize ukazale su na vremenski zavisnu reorganizaciju proliferativnih, metaboličkih i biosintetskih procesa, kao i procesa adhezije i remodelovanja vanćelijskog matriksa u odgovoru na tretman rilmenidinom. Rezultati ove disertacije ukazuju na NISCH kao biološki i prognostički relevantan regulator melanoma i pružaju osnovu za dalje ispitivanje rilmenidina kao kandidata za farmakološku prenamenu u onkologiji.

Ključne reči: melanom, nišarin, NISCH, imidazolinski I_1-receptor, rilmenidin

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna onkologija

Nischarin expression in metastatic melanoma and antitumor potential of its agonists *in vitro*

Abstract

Acquired resistance to once-effective therapies creates a continuing need for novel treatments for metastatic melanoma. Nischarin (NISCH) is a scaffolding protein reported to act as a tumor suppressor and a functional component of the imidazoline I_1-receptor. The aim of this dissertation was to investigate the expression, regulation, and clinical significance of NISCH in melanoma, as well as the antitumor potential of imidazoline I_1-receptor agonists. Analysis of public datasets and patient samples showed that NISCH expression was reduced in melanoma tissues compared with normal skin and nevi, with microdeletions and hypermethylation of the *NISCH* promoter contributing to this decrease. A previously undescribed nuclear localization of NISCH was also observed. In primary melanoma, *NISCH* expression had favorable prognostic significance in female patients, whereas, unexpectedly, higher *NISCH* expression in male patients was associated with poor prognosis. Among the examined agonists, rilmenidine showed the most pronounced antiproliferative effect and selectivity toward melanoma cell lines. Rilmenidine impaired tumor spheroid formation altered cell-cycle distribution, induced apoptosis, reduced cell adhesion and migration, and differentially affected invasion depending on the type of extracellular matrix. Transcriptomic analyses indicated a time-dependent reorganization of proliferative, metabolic, and biosynthetic processes, as well as processes related to adhesion and extracellular matrix remodeling, in response to rilmenidine treatment. Overall, the results of this dissertation identify NISCH as a biologically and prognostically relevant regulator in melanoma and provide a rationale for further investigation of rilmenidine as a candidate for drug repurposing in oncology.

Keywords: melanoma, nischarin, NISCH, imidazoline I_1-receptor, rilmenidine

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular oncology

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Melanom 1
1.1.1. Incidencija melanoma 1
1.1.2. Nastanak i progresija melanoma 1
1.1.3. Molekularne osnove nastanka i progresije melanoma 3
1.1.3.1. Ključni signalni putevi uključeni u nastanak i progresiju melanoma 3
1.1.3.2. Molekularna osnova invazije i metastaziranja melanoma 5
1.1.3.3. Interakcija melanoma sa imunskim mikrookruženjem 6
1.1.4. Terapija metastatskog melanoma 6
1.2. Prenamena lekova 7
1.2.1. Imidazolinski I_1-agonisti 7
1.2.2. Potencijal I_1-agonista za prenamenu u onkologiji 8
1.3. Nišarin 10
1.3.1. Humane izoforme nišarina 10
1.3.2. Ekspresija i fiziološke funkcije nišarina 12
1.3.3. Uloga nišarina u tumorskoj progresiji 13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 16
3. MATERIJAL I METODE 17
3.1. Analize sprovedene na parafinskim uzorcima pacijenata 17
3.1.1. Uzorci tkiva pacijenata 17
3.1.2. Analiza ekspresije *NISCH* kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze 17
3.1.3. Imunohistohemijsko bojenje 18
3.1.4. Analiza genomskih mikrodelecija 19
3.1.5. Metilaciono specifični PCR 21
3.2. Bioinformatičke analize javno dostupnih podataka 22
3.2.1. Preuzimanje i obrada podataka o ekspresiji gena *NISCH* i pratećim kliničkopatološkim karakteristikama 22
3.2.2. Analiza ekspresije nišarina – Humani proteinski atlas 23
3.2.3. Ekspresija transkripata i zastupljenost izoformi gena *NISCH* 23
3.2.4. Metilacioni status promotorskog regiona gena *NISCH* 23
3.2.5. Somatske promene 24
3.2.6. Analiza preživljavanja 24
3.2.7. Analiza obogaćenja genskih skupova 25
3.3. Eksperimenti izvedeni u ćelijskoj kulturi 25
3.3.1. Ćelijske linije 25

3.3.2. Određivanje nivoa ekspresije gena *NISCH* u ćelijskim linijama 27
3.3.3. *Western blot* analiza 27
3.3.4. Imunocitohemijska lokalizacija nišarina 28
3.3.5. MTT test vijabilnosti 29
3.3.6. Ispitivanje aktivnosti rilmenidina na modelu tumorskih sferoida 29
3.3.7. Ispitivanje efekata rilmenidina na formiranje tumorskih sferoida 30
3.3.8. Mikroskopska analiza vijabilnosti ćelija tretiranih rilmenidinom 31
3.3.9. Kvantifikacija apoptoze protočnom citometrijom 31
3.3.10. Analiza ćelijskog ciklusa primenom protočne citometrije 32
3.3.11. Uticaj tretmana na adheziju ćelija 32
3.3.12. Test zarastanja rane 33
3.3.13. *Transwell* testovi migracije i invazije 33
3.3.14. Sekvenciranje RNK 34
3.3.15. Analiza obogaćenosti genskih skupova nakon tretmana rilmenidinom 35
3.4. Statistička analiza 35
4. REZULTATI 37
4.1. Analiza ekspresije, regulacije i uloge nišarina u uzorcima pacijenata 37
4.1.1. Kliničkopatohistološke karakteristike IORS kohorte 37
4.1.2. Ekspresija *NISCH* gena tokom progresije melanoma 38
4.1.3. Ekspresija proteina nišarina 40
4.1.4. Ekspresija i zastupljenost transkripata *NISCH* gena 42
4.1.5. Regulacija ekspresije gena *NISCH* u melanomu 44
4.1.6. Analiza ukupnog preživljavanja pacijenata 48
4.1.7. Povezanost ekspresije gena *NISCH* sa kliničkopatološkim parametrima 50
4.1.8. Genske mreže povezane sa ekspresijom gena *NISCH* 52
4.2. Potencijal imidazolinskih I_1 agonista za prenamenu u lečenju melanoma 56
4.2.1. Bazalna ekspresija nišarina u ćelijskim linijama 56
4.2.2. Intracelularna lokalizacija NISCH proteina u A375 ćelijama 56
4.2.3. Uticaj agonista I_1-imidazolinskih receptora na ćelijsku vijabilnost u 2D modelu 57
4.2.4. Uticaj rilmenidina na ćelijsku vijabilnost i morfologiju sferoida 58
4.2.5. Inhibicija formiranja sfera u prisustvu rilmenidina 62
4.2.6. Mikroskopska evaluacija vijabilnosti i morfoloških promena A375 ćelija nakon tretmana rilmenidinom 67
4.2.7. Kvantifikacija apoptoze izazvane rilmenidinom 68
4.2.8. Uticaj rilmenidina na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa 71
4.2.9. Promene u ćelijskoj adheziji pod dejstvom tretmana 72
4.2.10. Uticaj rilmenidina na migratorni potencijal ćelija 74
4.2.11. Promene u sposobnosti kretanja tretiranih ćelija kroz *transwell* inserte 74
4.2.12. Uticaj rilmenidina na vremenski zavisne promene obogaćenosti genskih skupova 76

5. DISKUSIJA 81
5.1. Ekspresija i klinički značaj nišarina u melanomu 81
5.2. Antitumorski efekti agonista imidazolinskih I_1-receptora u ćelijskim modelima melanoma 86
5.3. Translacioni potencijal rilmenidina i ograničenja njegove prenamene 93
6. ZAKLJUČCI 95
7. LITERATURA 97

1. UVOD

1.1. Melanom

Melanom je najagresivniji i najsmrtonosniji oblik raka kože. Uprkos tome što čini svega 1-5 % svih kožnih maligniteta, odgovoran je za više od 75 % smrtnih ishoda povezanih sa karcinomima kože, pre svega zbog izraženog metastatskog potencijala i terapijske rezistencije u uznapredovalim stadijumima bolesti (Cabaço et al., 2022; Caraviello et al., 2025). Potiče iz melanocita, ćelija odgovornih za proizvodnju melanina, pigmenta koji daje boju koži i štiti je od ultraljubičastog zračenja. Prvi simptomi melanoma obično uključuju promene na postojećem mladežu ili pojavu novog, neobičnog mladeža. Rano otkrivanje znatno povećava verovatnoću izlečenja, jer sa progresijom bolesti tumorske ćelije metastaziraju najpre u regionalne limfne čvorove, a zatim i u udaljene organe poput pluća, jetre i mozga, što značajno pogoršava prognozu. Napredak u imunoterapiji i ciljanim terapijama je doveo do produženja preživljavanja kod dela pacijenata sa uznapredovalim i metastatskim melanomom, ali rezistencija na terapiju i dalje predstavlja čest klinički problem. Kako incidencija melanoma globalno raste, javlja se i sve veća potreba za novim terapijskim pristupima.

1.1.1. Incidencija melanoma

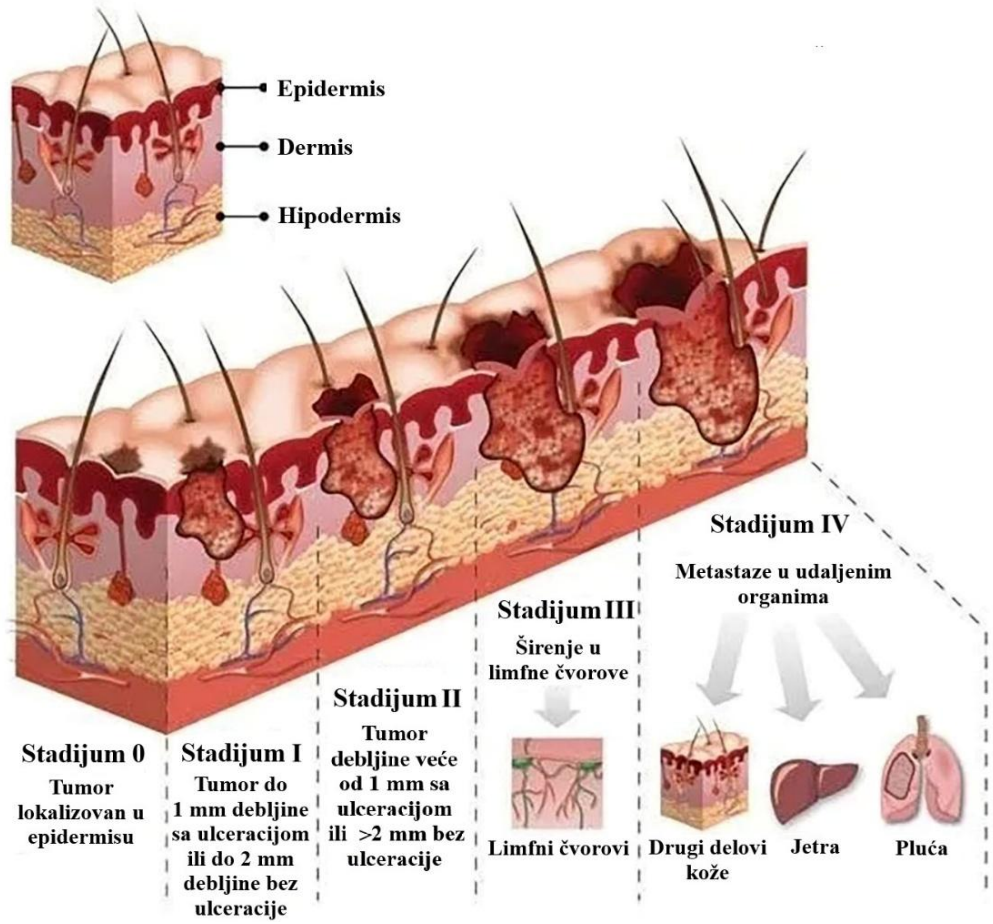
Melanom kože je 17. najčešće dijagnostikovan malignitet u svetu, sa oko 337.969 novih slučajeva i 58.398 smrtnih ishoda u 2024. godini (Sung et al., 2026). Iako trendovi melanoma nisu uniformni i razlikuju se u zavisnosti od zemlje, epidemiološki podaci pokazuju da je u poslednjim decenijama učestalost melanoma rasla godišnje za 4-6 % u mnogim razvijenim zemljama (N. H. Matthews et al., 2017), dok se broj novodijagnostikovanih invazivnih melanoma u Sjedinjenim Američkim Državama povećao za oko 46,6 % u protekloj deceniji (*Cancer Facts & Figures 2026 | American Cancer Society*, n.d.). Predikcije koje uzimaju u obzir demografske promene i starenje stanovništva ukazuju na očekivani dalji porast apsolutnog opterećenja melanomom u narednim decenijama globalno (Arnold et al., 2022; Oh et al., 2026).

Prema procenama baze Globalnog opservatorijuma za rak GLOBOCAN 2022, melanom je u 2022. godini bio 13. najučestaliji kancer u Srbiji sa 901 novoobolelom osobom, a 321 osoba je preminula od ove bolesti (*GLOBOCAN 2022, Serbia*, n.d.). Epidemiološki podaci ukazuju na kontinuirani porast smrtnosti od melanoma u Srbiji tokom poslednjih decenija. Analiza nacionalnih podataka za period 2000-2021. godine pokazala je uzlazni trend mortaliteta, a porast smrtnosti bio je izraženiji kod muškaraca nego kod žena, dok su najviše stope zabeležene u najstarijim starosnim grupama (Babic et al., 2024). Slični rezultati zabeleženi su i u ranijoj studiji za centralnu Srbiju (1999-2015. godine), gde je prosečna standardizovana stopa smrtnosti iznosila 2,6 na 100 000 stanovnika, sa značajno višim vrednostima kod muškaraca i izraženim porastom stopa sa starenjem populacije (Pantovic et al., 2023). Ovi rezultati ukazuju na potrebu za unapređenjem preventivnih strategija i ranog otkrivanja, kao i unapređenju lečenja uznapredovalih stadijuma melanoma.

1.1.2. Nastanak i progresija melanoma

Koža predstavlja najveći organ ljudskog tela čiju anatomsku strukturu čine tri glavna sloja: epidermis (spoljašnji sloj, pokožica), dermis (srednji sloj, krzno) i hipodermis (najdublji sloj, poznat i kao subkutis ili potkožno tkivo) (Slika 1.1). Epidermis je avaskularan sloj kože čija debljina iznosi približno 0,05-0,1 mm na većini delova tela, dok na dlanovima i tabanima može dostići i do 1,5 mm. Dermis je izgrađen od gustog vezivnog tkiva bogatog fibroblastima, i u njemu se nalaze krvni sudovi,

nervi, žlezde i folikuli dlaka. Hipodermis je pretežno sastavljen od masnog tkiva koje obezbeđuje izolaciju, amortizaciju i rezervu energije (Lopez-Ojeda et al., 2022). Glavne ćelije epidermisa su keratinociti, koji čine oko 95 % svih epidermalnih ćelija i proizvode keratin, protein koji obezbeđuje čvrstinu i vodonepropusnost kože. Uz keratinocite, najbrojniji tip ćelija zastupljenih u epidermisu su melanociti, kojih ima oko 5 % i koji su odgovorni za stvaranje pigmenta melanina koji kožu štiti od ultraljubičastog (eng. *ultraviolet,* UV) zračenja (Lopez-Ojeda et al., 2022; Yousef et al., 2024).



Slika 1.1. Anatomska i histološka građa kože i prikaz progresije melanoma kroz kliničke stadijume. Preuzeto i prerađeno sa sajta: https://calgaryskincancer.com/melanoma

Melanom nastaje malignom transformacijom melanocita, ćelija neuroektodermalnog porekla koje se nalaze uz bazalnu laminu, tj. donji sloj epidermisa ka dermisu, i u korenu folikula dlake. Česta je pojava da se melanociti nepravilno grupišu i dele, pri čemu nastaju dobroćudne obojene promene na koži, mladeži (melanocitni nevusi). U zdravoj koži i mladežima melanociti održavaju blizak funkcijski odnos sa keratinocitima, uključujući međućelijske adhezivne veze i regulaciju rasta putem parakrinih signala, zadržavajući regulisanu proliferaciju. Međutim, ukoliko dođe do maligne transformacije, dolazi do gubitka ovih regulatornih mehanizama, uključujući smanjenu ekspresiju adhezionih molekula, što omogućava melanomskim ćelijama da se odvoje od keratinocita, nekontrolisano se dele i migriraju u dermis (Vandyck et al., 2021). U klasičnom modelu progresije melanoma koji su opisali *Clark* i saradnici (Clark et al., 1984), početnu radijalnu fazu rasta, koju karakteriše pretežno horizontalno širenje tumorskih ćelija u epidermisu i površnom dermisu, smenjuje vertikalna faza rasta, tokom koje ćelije prodiru dublje u dermis i stiču izraženiji metastatski potencijal.

Zavisno od napredovanja bolesti, razlikuju se klinički stadijumi koji se određuju prema važećoj klasifikaciji Američkog zajedničkog komiteta za rak (eng. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) (Slika 1.1). Početni oblik, melanom *in situ* (stadijum 0), lokalizovan je isključivo u epidermisu i može se jednostavno hirurški ukloniti, što uglavnom vodi potpunom izlečenju (Karponis et al., 2025). Stadijumi I i II označavaju lokalizovanu bolest u kojoj tumor probija bazalnu membranu i prodire u dublji sloj kože, dermis. Kada prodru u dermis, ćelije melanoma uspostavljaju kontakt sa ekstracelularnim matriksom i fibroblastima, odakle kroz limfne i krvne sudove mogu metastazirati regionalno (stadijum III) ili u udaljene organe (stadijum IV) (Keung & Gershenwald, 2018). Upravo zbog agresivnog rasta i sklonosti ka ranom metastaziranju, melanom se smatra klinički najagresivnijim tipom raka kože.

Patogeneza melanoma je višefaktorska i obuhvata međusobno delovanje genetičke predispozicije, individualnih karakteristika i faktora životne sredine. Intrinzični faktori rizika obuhvataju genetsku predispoziciju, uključujući porodičnu istoriju melanoma i prisustvo naslednih mutacija, starost, pol, etničko poreklo, broj i tip mladeža, sposobnost tamnjenja kože, kao i faktore poput gojaznosti i imunosupresije koji povećavaju rizik (Law et al., 2012; Whiteman et al., 2025). Starost i pol su posebno značajni, jer rizik od melanoma raste sa godinama, sa najagresivnijim oblicima kod osoba starijih od 70 godina, a muškarci imaju lošiju prognozu (Garbe & Leiter, 2009). Ipak, procenjuje se da je oko 80-95 % slučajeva melanoma povezano sa izloženošću UV zračenju i da je primarni uzrok melanoma oštećenje dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) u melanocitima izazvano izlaganjem suncu ili veštačkim izvorima UV zračenja, poput solarijuma (Armstrong & Kricker, 2001; Islami et al., 2020; X. Sun et al., 2020).

1.1.3. Molekularne osnove nastanka i progresije melanoma

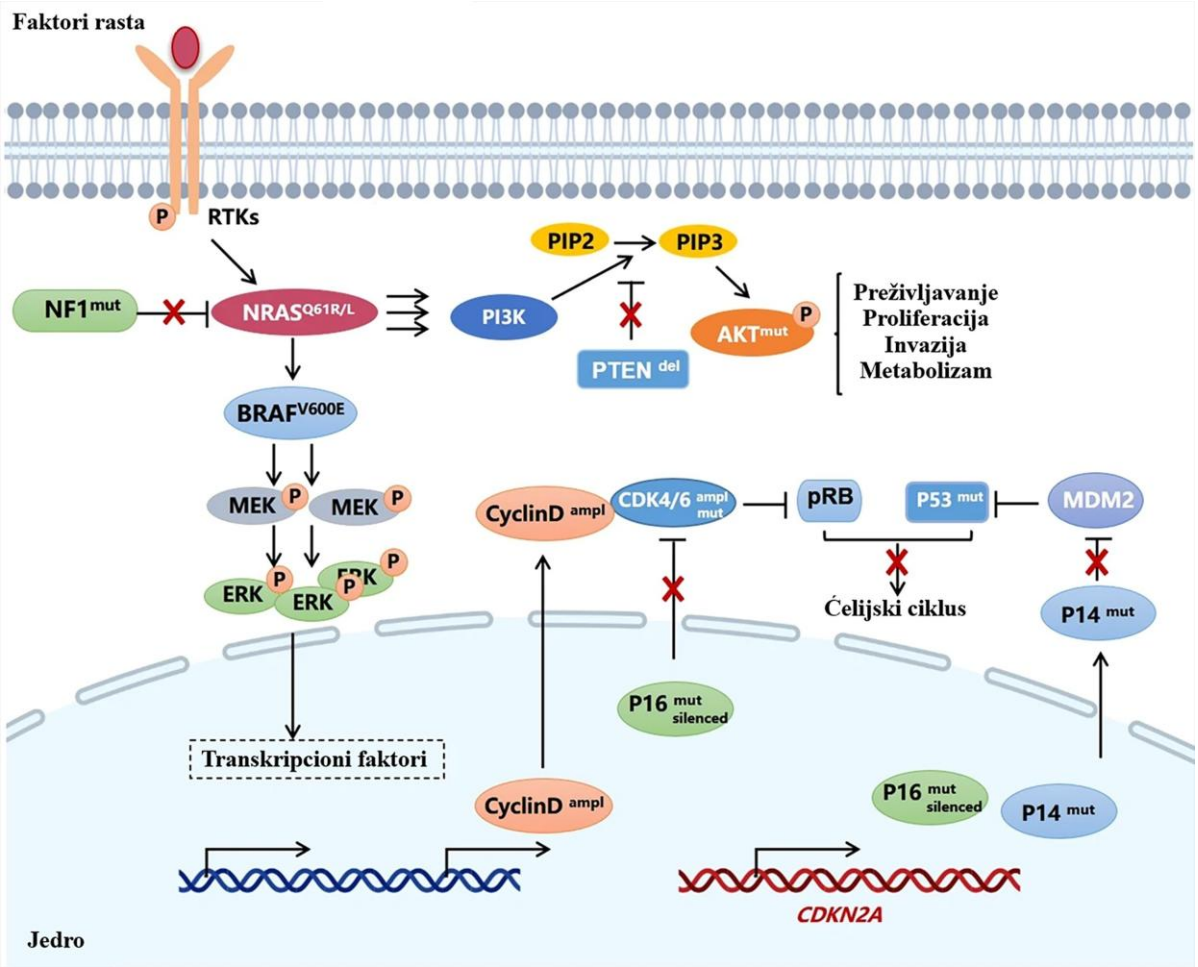
Napredak u tehnologiji sekvenciranja genoma u poslednjim decenijama omogućio je detekciju širokog spektra genomskih promena i doveo do značajnih saznanja o molekularnim događajima koji pokreću razvoj i progresiju melanoma. Melanom se odlikuje izraženom genetskom nestabilnošću i velikim brojem somatskih mutacija, kao i epigenetskih promena kao što su metilacija DNK, modifikacije histona, deregulacija ekspresije nekodirajućih mikroribonukleinskih kiselina (eng. *microRNA*, miRNA) i dugih nekodirajućih ribonukleinskih kiselina (RNK) (eng. *long non-coding RNA*, lncRNA) (Valdez-Salazar et al., 2024). Kao rezultat akumulacije molekularnih promena u određenim genima, dolazi do poremećaja signalnih puteva odgovornih za preživljavanje ćelija, proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i izbegavanje imunskog odgovora, i posledično do nastanka i širenja melanoma.

1.1.3.1. Ključni signalni putevi uključeni u nastanak i progresiju melanoma

Razvoj melanoma predstavlja složen, višestepeni proces tokom kojeg se akumuliraju genetičke i epigenetičke promene koje melanocitima omogućavaju nekontrolisanu proliferaciju, izbegavanje ćelijske senescencije i apoptoze, metaboličku adaptaciju i sticanje invazivnog fenotipa (Guo et al., 2021; Shain & Bastian, 2016). Među najvažnijim molekularnim događajima izdvajaju se aktivacija signalnog puta mitogenom aktiviranih protein-kinaza (eng. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i signalnog puta fosfatidilinozitol-3-kinaze i protein-kinaze B (eng. *phosphoinositide 3-kinase / protein kinase B*, PI3K/AKT) i gubitak kontrole ćelijskog ciklusa (Slika 1.2).

Jedan od najznačajnijih poremećaja u melanomu jeste konstitutivna aktivacija MAPK signalnog puta, poznatog i kao RAS-RAF-MEK-ERK kaskada (RAS i RAF – porodice signalnih proteina; MEK – kinaza MAPK/ERK, eng. *MAPK/ERK kinase*; ERK – kinaza regulisana ekstracelularnim signalima, eng. *extracellular signal-regulated kinase*), koja se najčešće ostvaruje mutacijama gena *BRAF* (eng. *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) i *NRAS* (eng. *NRAS proto-oncogene, GTPase*). Mutacije gena *BRAF* prisutne su u približno polovini kožnih melanoma,

pri čemu je najčešća *V600E* varijanta, dok se mutacije gena *NRAS* javljaju u približno 15-25 % slučajeva (Akbani et al., 2015; Chatziioannou et al., 2026; Harvey et al., 2022). Ove promene dovode do konstitutivne aktivacije MAPK signalizacije i promenjene ekspresije gena uključenih u proliferaciju, preživljavanje, diferencijaciju i pokretljivost ćelija (Lavoie & Therrien, 2015; Wellbrock & Arozarena, 2016). Smatra se da je MAPK put funkcijski hiperaktivisan u više od 90 % svih melanoma (Wellbrock & Arozarena, 2016). Pored njega, važnu ulogu u nastanku i progresiji melanoma ima PI3K/AKT signalni put, čija signalizacija može biti pojačana aktivirajućim promenama njegovih komponenti ili gubitkom funkcije tumor-supresora PTEN (eng. *phosphatase and tensin homolog*), čime se podstiču preživljavanje, proliferacija i metabolička adaptacija tumorskih ćelija (Guo et al., 2021; Motwani & Eccles, 2021; Palmieri et al., 2018).



Slika 1.2. Prikaz MAPK, PI3K/AKT i puteva povezanih sa inhibitorom ciklin-zavisnih kinaza 2A (eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, CDKN2A), koji su najčešće promenjeni u kožnom melanomu; preuzeto i modifikovano (Guo et al., 2021). P – fosforilacija, fosforilisani protein (eng. *phosphorylation*); Ampl – amplifikacija (eng. *amplification*); del – delecija (eng. *deletion*); mut – mutacija (eng. *mutation*); *silenced* – utišan gen. RTKs – receptorske tirozin-kinaze (eng. *receptor tyrosine kinases*); NF1 – neurofibromin 1; PIP2 – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat; PIP3 – fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat; CDK4/6 – ciklin-zavisne kinaze 4 i 6; pRB – protein retinoblastoma; MDM2 – eng. MDM2 proto-oncogene; p53 – tumor-supresorski protein p53; p14 i p16 – proteini p14ARF (eng. *alternate reading frame*) i p16INK4A (eng. *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A*), kodirani genom *CDKN2A*.

Malignoj transformaciji dodatno doprinosi narušavanje kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, naročito inaktivacija tumor-supresorskog gena *CDKN2A*, koji kodira dva funkcijski različita tumor-supresorska proteina, $p16^{INK4A}$ (eng. *p16 inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A*) i $p14^{ARF}$ (eng. *p14 alternate reading frame protein*) (Akbani et al., 2015; Guo et al., 2021). Protein $p16^{INK4A}$ se vezuje za ciklin-zavisne kinaze 4 i 6 (eng. *cyclin-dependent kinases 4/6*, CDK 4/6) i inhibira njihovu aktivnost u kompleksu sa ciklinom D. Time se sprečavaju fosforilacija i funkcionalna inaktivacija proteina RB (eng. *retinoblastoma protein*) i prelazak ćelije iz G_1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Bartkova et al., 1996; Guo et al., 2021). Protein $p14^{ARF}$ vezuje i inhibira MDM2 (eng. *MDM2 proto-oncogene*), čime sprečava razgradnju tumor-supresorskog proteina p53 i omogućava ostvarivanje njegove tumor-supresorske funkcije (Stott et al., 1998).

Zajedničko dejstvo poremećaja MAPK i PI3K/AKT signalnih puteva, kao i gubitka kontrolnih mehanizama ćelijskog ciklusa, omogućava tumorskim ćelijama pojačano preživljavanje, proliferaciju, invaziju i metaboličku prilagodljivost.

1.1.3.2. Molekularna osnova invazije i metastaziranja melanoma

Progresija melanoma od lokalizovanog primarnog tumora do invazivnog metastatskog oblika uključuje promene u ćelijskoj ekspresiji adhezionih molekula, proteolitičku razgradnju ekstracelularnog matriksa i reorganizaciju citoskeleta, koje omogućavaju aktivno kretanje tumorskih ćelija (Lambert et al., 2017). Za razliku od normalnih ćelija zavisnih od adhezije, kod kojih gubitak kontakta sa ekstracelularnim matriksom pokreće programiranu ćelijsku smrt poznatu kao anoikis, ćelije melanoma razvijaju otpornost na ovaj mehanizam aktivacijom različitih puteva preživljavanja, uključujući PI3K/AKT i MAPK signalizaciju (Adeshakin et al., 2021; Koltai & Fliegel, 2026; Neuendorf et al., 2023). Ova adaptacija im omogućava da prežive nakon odvajanja od matriksa dok plutaju u krvi ili limfi u stanju suspenzije, povećavajući verovatnoću nastanka metastatskih žarišta (Neuendorf et al., 2023; Paoli et al., 2013).

Važnu ulogu u migraciji ćelija ima dinamičko remodelovanje fokalnih adhezija. Ovi multiproteinski kompleksi povezuju ekstracelularni matriks sa aktinskim citoskeletom, pri čemu integrini posreduju ovu interakciju preko adaptornih proteina poput talina, vinkulina i paksilina (Katoh, 2024). Naizmenično formiranje fokalnih adhezija na vodećoj ivici migrirajuće ćelije i njihova razgradnja na zadnjem delu omogućavaju njeno usmereno kretanje, dok istovremeno ovi kompleksi prenose biohemijske i mehaničke signale iz mikrookruženja (Katoh, 2024). Jedan od važnih regulatora ovog procesa je fokalna adheziona kinaza (eng. *Focal Adhesion Kinase*, FAK), koja povezuje signale iz fokalnih adhezija sa intracelularnim putevima uključenim u preživljavanje, migraciju i invaziju (W. Fu et al., 2012; Katoh, 2024).

Integrinska i FAK signalizacija povezane su sa aktivacijom PI3K/AKT i MAPK puteva, kao i sa regulacijom Rho guanozin-trifosfataza (GTPaza), prvenstveno RhoA (eng. *ras homolog family member A*), Rac1 (eng. *Rac family small GTPase 1*) i Cdc42 (eng. *cell division cycle 42*) (W. Fu et al., 2012; Mishra et al., 2026). Ovi proteini koordiniraju organizaciju aktinskog citoskeleta, dinamiku adhezija i formiranje protruzivnih struktura neophodnih za kretanje ćelija, uključujući lamelipodije i filopodije, a učestvuju i u regulaciji invadopodija (Mishra et al., 2026). Invadopodije su membranske protruzije koje vrše lokalizovanu degradaciju ekstracelularnog matriksa putem sekrecije proteolitičkih enzima, naročito matriksnih metaloproteinaza, i omogućavaju prolazak tumorskih ćelija kroz tkivne barijere (Revach & Geiger, 2014).

Uloga FAK u regulaciji migracije i invazije melanoma zavisi od njenog intracelularnog konteksta i interakcija sa drugim komponentama adhezionih kompleksa. Dok smanjena aktivnost FAK može ograničiti migraciju, istovremeno može povećati formiranje invadopodija i degradaciju matriksa (Kolli-Bouhafs et al., 2014; Mousson et al., 2021). Nasuprot tome, specifično ometanje interakcije između FAK i paksilina smanjuje i migraciju i invadopodijama posredovanu degradaciju matriksa u metastatskim ćelijama melanoma (Mousson et al., 2021).

1.1.3.3. Interakcija melanoma sa imunskim mikrookruženjem

Iako se melanom smatra jednim od najimunogenijih tumora sa čestim prisustvom izraženog infiltrata tumorski infiltrirajućih limfocita, ćelije melanoma razvijaju brojne mehanizme izbegavanja antitumorskog imunskog odgovora (Q. Fu et al., 2019). Posebno je značajna aktivacija imunskih kontrolnih tačaka (eng. *immune checkpoints*), uključujući PD-1/PD-L1 (eng. *programmed cell death protein 1 / programmed death ligand 1*) i CTLA-4 (eng. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4*), kojima se ograničavaju aktivacija i efektorska funkcija T-limfocita (Pardoll, 2012; F. Zhang et al., 2017).

Razumevanje ovih kompleksnih mehanizama postavilo je temelj za savremenu terapiju, dok istovremeno pruža ključne uvide u molekularne osnove primarne i stečene rezistencije na lečenje i recidiva bolesti.

1.1.4. Terapija metastatskog melanoma

Pre uvođenja modernih terapija, pacijenti sa neoperabilnim metastatskim melanomom imali su vrlo lošu prognozu sa medijanom ukupnog preživljavanja od svega 6 do 9 meseci zbog ograničene efikasnosti tradicionalnih tretmana kao što su hemoterapija i radioterapija (C. Kim et al., 2010). Tokom poslednje dve decenije uvedeni su inhibitori kontrolnih tačaka (eng. *checkpoint inhibitors*) poput anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) i anti-CTLA-4 (ipilimumab), kao i ciljane terapije za tumore sa specifičnim mutacijama (npr. BRAF inhibitori i MEK inhibitori), koje su dramatično poboljšale ishode pacijenata u metastatskom stadijumu (Knight et al., 2023). Savremeni režimi lečenja dovode do produženja preživljavanja na nekoliko godina, a kod određenog broja pacijenata beleže se dugotrajni odgovori, sa petogodišnjim i desetogodišnjim preživljavanjem (Michielin et al., 2020). Ipak, značajan deo pacijenata sa uznapredovalim melanomom doživljava progresiju bolesti uprkos modernoj terapiji.

U većini zemalja, uključujući Srbiju, rutinski se sprovodi genetičko testiranje na prisustvo BRAF V600 mutacije, koja se javlja u oko 50 % slučajeva metastatskog melanoma i predstavlja važan prediktivni biomarker za ciljanu terapiju (Giunta et al., 2020). Terapija BRAF inhibitorima, posebno u kombinaciji sa MEK inhibitorima, značajno poboljšava odgovor i preživljavanje, ali kod mnogih pacijenata se razvija rezistencija nakon prosečno oko šest meseci (Torres-Collado et al., 2018). S druge strane, procenjuje se da oko 40-45 % pacijenata sa metastatskim melanomom ima primarnu rezistenciju na inhibitore kontrolnih tačaka, dok kod onih koji prvobitno reaguju na terapiju oko 30-40 % dolazi do razvoja sekundarne rezistencije i progresije bolesti nakon određenog perioda stabilnosti (Mooradian & Sullivan, 2019).

Dodatni problem predstavlja i to što inovativne terapije za metastatski melanom nisu dostupne svim pacijentima, naročito u zemljama sa slabije razvijenim zdravstvenim sistemom ili nižim ekonomskim resursima (Mooradian & Sullivan, 2019). Pacijentima sa metastatskim melanomom u Srbiji trenutno su dostupne ciljane terapije, uključujući BRAF inhibitore (vemurafenib i dabrafenib) i MEK inhibitore (trametinib i cobimetinib), kao i imunoterapija poput nivolumaba i pembrolizumaba, koji deluju kao anti-PD-1 inhibitori (*Lista C. Lekovi Sa Posebnim Režimom Izdavanja*, n.d.).

Međutim, pristup nekim kombinovanim režimima i najnovijim modalitetima lečenja je još uvek ograničen, najčešće zbog visokih troškova i regulatornih prepreka. Zbog toga je hitno potreban razvoj novih terapijskih pristupa koji bi omogućili efikasniji i pristupačniji tretman metastatskog melanoma.

1.2. Prenamena lekova

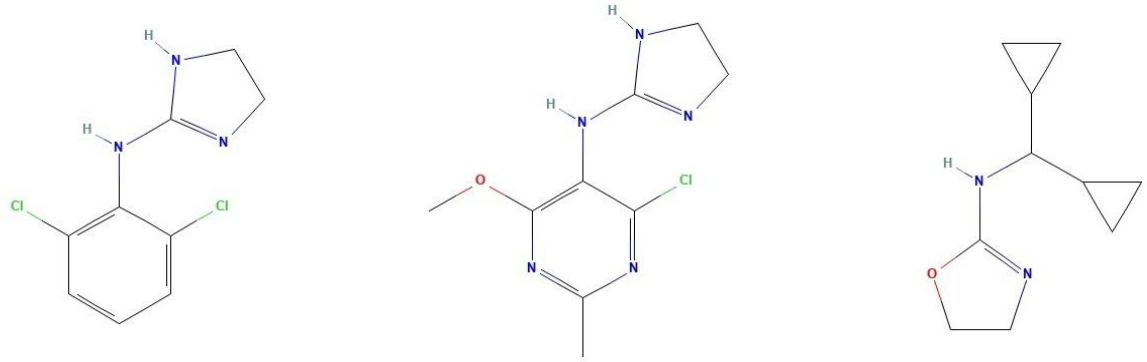
Proces razvoja novih lekova je izuzetno dugotrajan i skup, a samo mali broj kandidata uspešno prođe sve faze pretkliničkih i kliničkih ispitivanja i nađe se na tržištu. Klasičan razvoj potpuno novog leka može trajati 10-15 godina, pri čemu se od mnogih kandidata odustane usled neuspeha u kasnim fazama kliničkih ispitivanja zbog nepovoljnih rezultata bezbednosti i efikasnosti. Troškovi razvoja novog leka izuzetno su visoki i, prema različitim procenama, iznose od 1,56 do 2,8 milijardi američkih dolara, uključujući i troškove neuspešnih pokušaja razvoja (O. J. Wouters et al., 2020). Direktna posledica toga je da su cene novih lekova visoke, te oni nisu dostupni svim pacijentima, posebno u siromašnijim zemljama. Zbog ovih izazova, ideja prenamene lekova (eng. drug repurposing) postaje sve popularnija, jer omogućava identifikaciju novih indikacija za lekove koji su već odobreni i koji su prošli značajnu farmakološku i bezbednosnu evaluaciju. Od 1985. do 2024. godine zabeležen je 451 slučaj prenamene lekova, pri čemu onkologija i neurološke bolesti predstavljaju glavne terapijske oblasti u kojima se ova strategija primenjuje (Akodad et al., 2026). Prenamenom lekova u onkologiji se vreme i troškovi razvoja mogu značajno smanjiti u odnosu na tradicionalni put razvoja potpuno novog molekula. Na ovaj način se lekovima koji su već detaljno farmakološki i toksikološki okarakterisani omogućava brža translacija u kliničku praksu i povećava se dostupnost terapijskih opcija za onkološke pacijente.

Potencijal za prenamenu u onkologiji pokazuju i lekovi koji se primenjuju u hroničnoj terapiji kardiovaskularnih bolesti, među kojima i agonisti imidazolinskog I_1 receptora.

1.2.1. Imidazolinski I_1-agonisti

Imidazolinski receptori (eng. *imidazoline receptors,* IR) predstavljaju heterogenu grupu neadrenergičkih vezivnih mesta koja pokazuju afinitet prema jedinjenjima sa imidazolinskom strukturom. Na osnovu farmakoloških, biohemijskih i funkcionalnih karakteristika, klasifikovani su u tri glavne podgrupe: I_1, I_2 i I_3 receptore (Bousquet et al., 2020). Među njima, I_1-IR su najviše proučavani zbog njihove značajne uloge u regulaciji kardiovaskularne funkcije.

Ekspresija I_1-IR je široko zastupljena u organizmu, sa najvišim nivoima u centralnom nervnom sistemu, gde učestvuju u modulaciji aktivnosti simpatičkog nervnog sistema. Smatra se da su harman i harmalan (Parker et al., 2004), ribozid-imidazol-sirćetne kiseline (eng. *imidazol-4-acetic acid-ribotide,* IAA-RP) (Prell et al., 2004) i agmatin (G. Li et al., 1994) prirodni endogeni ligandi ovog podtipa receptora (Nikolić et al., 2013). Pored endogenih, postoje i sintetički agonisti I_1 imidazolinskih receptora, od kojih su najznačajniji oni koji se koriste u kliničkoj praksi: klonidin, rilmenidin i moksonidin (Bousquet et al., 2020). Njihove hemijske strukture su prikazane na Slici 1.3. Sintetički agonisti deluju centralno, stimulišući I_1-imidazolinske receptore u rostralnoj ventrolateralnoj meduli (eng. r*ostral ventrolateral medulla, RVLM*) u produženoj moždini, što dovodi do inhibicije simpatičkog nervnog sistema (Bousquet, 2000). Ova aktivacija rezultira snižavanjem krvnog pritiska i redukcijom srčane frekvencije, zbog čega se ovi lekovi primarno primenjuju u terapiji esencijalne hipertenzije i, prema određenim protokolima, u lečenju srčane insuficijencije (Bousquet et al., 2020; Farsang & Kapocsi, 1999).



Klonidin **Moksonidin** **Rilmenidin**

Slika 1.3. Hemijske strukture klinički odobrenih agonista I_1-imidazolinskog receptora. Preuzeto sa sajta *PubChem* (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

Klonidin je mešoviti agonista imidazolinskog I_1 i adrenergičkog α_2-receptora. Budući da se snažno vezuje za α_2-receptore, njegova primena često izaziva neželjene efekte kao što su sedacija i suvoća usta. Kako bi se poboljšala efikasnost antihipertenzivne terapije i minimizovao uticaj na α_2-adrenergičke receptore, strukturnim modifikacijama razvijena je druga generacija ovih lekova. Tako su sintetisani selektivni agonisti moksonidin i rilmenidin, koji poseduju značajno veći afinitet i izrazitu selektivnost za I_1-IR u odnosu na α_2-receptore i ostale podtipove imidazolinskih receptora (Bousquet et al., 2020; Nikolić et al., 2013). Koriste se primarno za lečenje esencijalne hipertenzije, gde pokazuju efikasnost sličnu diureticima, beta-blokatorima, kalcijumskim antagonistima i inhibitorima angiotenzin-konvertujućeg enzima (Edwards et al., 2012; Reid, 2000). Uglavnom se koriste kod pacijenata kod kojih su druge klase lekova manje efikasne ili uzrokuju neprihvatljive neželjene efekte, a posebno su značajni kod pacijenata sa komorbiditetima poput dijabetesa ili dislipidemije, jer utiču povoljno na metaboličke parametre (De Luca et al., 2000; Edwards et al., 2012; Laurent & Safar, 1992; Reid, 2000).

Klonidin, moksonidin i rilmenidin imaju različit globalni regulatorni status. Klonidin je odobren od strane Uprave za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) Sjedinjenih Američkih Država i široko se primenjuje širom sveta. Nasuprot tome, moksonidin i rilmenidin nemaju odobrenje FDA, ali su registrovani i koriste se u brojnim evropskim i drugim zemljama sveta. U dostupnim farmaceutskim preparatima rilmenidin se primenjuje u obliku film tableta koje sadrže rilmenidin-dihidrogenfosfat kao aktivnu supstancu. Zbog svoje visoke selektivnosti prema I_1 imidazolinskim receptorima i povoljnog profila neželjenih efekata, moksonidin i rilmenidin imaju značajan terapijski i istraživački potencijal.

1.2.2. Potencijal I_1-agonista za prenamenu u onkologiji

Klonidinu, neselektivnom agonisti sa visokim afinitetom i za α_2-adrenergičke i za I_1-imidazolinske receptore, se poslednjih godina posvećuje velika pažnja u onkologiji zbog njegove upotrebe u palijativnoj nezi pacijenata u terminalnim fazama kancera, gde zahvaljujući svom analgetskom efektu smanjuje potrebne doze opioida za suzbijanje bolova (Amna et al., 2024). Međutim, istraživanja na polju prenamene klonidina u onkologiji pružaju kompleksne i delom kontradiktorne rezultate. Pokazano je da, usled efekata na α_2-adrenergičke receptore, klonidin u specifičnim dozama može promovisati rast tumora *in vitro* i u *in vivo* mišjem modelu, dok u drugim uslovima indukuje apoptozu (Bruzzone et al., 2008). Da bi se stekao uvid u uticaj klonidina na tumorsku progresiju u ljudskom organizmu, analizirani su njegovi efekti kod pacijenata sa rakom dojke ili pluća koji su primali niske doze klonidina tokom operacija karcinoma, kada je rizik od

rasejavanja tumora najveći usled hirurškog stresa i oslobađanja kateholamina. Perioperativna primena klonidina radi kontrole krvnog pritiska i analgezije je bila bezbedna i nije pogoršala ishode preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja u poređenju sa kontrolnom grupom (Forget et al., 2018). Kontradiktorni laboratorijski podaci i izostanak značajnih promena u preživljavanju pacijenata navode na zaključak da su efekti klonidina na α_2-adrenergičke i za I_1-imidazolinske receptore ispreplетani u kompleksnom mikrookruženju tumora kod ljudi i da su potrebna dodatna istraživanja radi procene koristi i rizika njegove prenamene u onkologiji.

Sa druge strane, pokazano je da moksonidin, klinički odobreni selektivni I_1 agonist, poseduje antitumorski potencijal. Na ćelijskim linijama trostruko negativnog karcinoma dojke, sam moksonidin u niskoj dozi nije drastično smanjivao broj ćelija, ali kombinovana primena moksonidina sa citostaticima značajno je pojačala indukciju apoptoze u poređenju sa primenom samih citostatika (Lincoln Edwards et al., 2011). U drugoj studiji pokazano je da moksonidin povećava ekspresiju tumor supresora nišarina i smanjuje rast ćelija trostruko negativnog raka dojke *in vitro* (Khosla et al., 2025).

Istraživanja sprovedena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije pokazala su da rilmenidin, klinički odobreni agonist I_1-imidazolinskih receptora sa izrazitom selektivnošću za ovaj receptor, efikasno inhibira proliferaciju i indukuje apoptozu K562 tumorskih ćelija (Srdic-Rajic et al., 2016). Molekularni mehanizam ovog proapoptotskog dejstva obuhvata stimulaciju proapoptotskog proteina Bax (eng. *Bcl-2-associated X protein*), perturbaciju mitohondrijalnog puta, kao i deaktivaciju Ras/MAP kinaza, a prvenstveno ERK, p38 i JNK (eng. *c-Jun N-terminal kinase*) (Srdic-Rajic et al., 2016). Dodatne studije potvrđuju da rilmenidin smanjuje vijabilitet ćelija raka dojke, debelog creva i pankreasa *in vitro* (Khosla et al., 2025; Ostojić et al., 2024; Živić et al., 2026).

Značajan iskorak u ispitivanju antimetastatskog potencijala rilmenidina ostvaren je u modelu duktalnog adenokarcinoma pankreasa, kod kojeg razvijena stroma i rano metastaziranje predstavljaju glavne prepreke efikasnom lečenju. Fibroblasti povezani sa kancerom (eng. *carcinoma-associated fibroblasts*, CAFs), kao dominantna komponenta tumorske strome, mogu ograničiti efikasnost hemioterapije i ciljane terapije, ali i lučiti signalne molekule koji podstiču progresiju tumora i metastaziranje (Biffi et al., 2019). Naša istraživačka grupa je pokazala da rilmenidin smanjuje ekspresiju aktivacionih markera na fibroblastima povezanim sa kancerom i uspešno ograničava citokinsku komunikaciju između tumorskih ćelija i CAFs (Živić et al., 2026). Pored toga, pokazana je i inhibicija migracije ćelija raka pankreasa pod dejstvom ovog leka *in vitro*, posredovana inhibicijom aktivnosti GTPaze Rac1, a antitumorski i antiinvazivni potencijal iz *in vitro* uslova uspešno su potvrđeni i na *in vivo* modelu zebrice, *Danio rerio*, gde je tretman ovim antihipertenzivom doveo do značajnog smanjenja metastatskog širenja ćelija raka pankreasa (Živić et al., 2026).

Pored lekova koji se već primenjuju u kliničkoj praksi, pretklinička istraživanja ukazuju da i pojedini endogeni i drugi sintetički ligandi sa visokim afinitetom za imidazolinske receptore mogu ispoljiti antitumorsku aktivnost kroz antiproliferativne, proapoptotske i antiinvazivne efekte. Utvrđeno je da agmatin ima antiproliferativne i antimetastatske efekte *in vitro*, kao i da suzbija rast tumora sarkoma i melanoma u mišjim modelima (H. Kim & Kim, 2017; J. Wang et al., 2005). *In vitro* studija na PC12 ćelijama pokazala je da benazolin, selektivni agonist imidazolinskih I_1-receptora, indukuje apoptozu u uslovima deprivacije seruma delovanjem na I_1 imidazolinski receptor (Dupuy et al., 2004). Pored benazolina, još jedan selektivni ligand imidazolinskih I_1 receptora, S43126, takođe dovodi do dozno zavisne ćelijske smrti i karakterističnog formiranja apoptotskih tela u PC12 ćelijama, pri čemu su ovi efekti delimično posredovani produkcijom reaktivnih vrsta kiseonika, aktivacijom MAPK signalnog puta i kaspaza (McLean et al., 2014). Tizanidin hidrohlorid, centralno delujući mišićni relaksans sa oko 20 puta većim afinitetom prema imidazolinskim mestima nego prema α_2-adrenoreceptorima (Muramatsu & Kigoshi, 1992), inhibirao je proliferaciju, invaziju i migraciju A549 ćelija uzrokovane utišavanjem ekspresije nišarina (Zhao et al., 2020).

Navedeni efekti i raznovrsnost delovanja komercijalnih terapeutika i eksperimentalnih liganada jasno ukazuju na to da klasa jedinjenja sa afinitetom za imidazolinske receptore ima izuzetno perspektivnu osnovu za potencijalne nove primene u terapiji različitih maligniteta. Prenamenom klinički već odobrenih agonista imidazolinskih receptora kod pacijenata sa metastatskim

melanomom, ali i drugim malignitetima, relativno brzo bi se pružio bezbedan, jeftin i klinički već ispitan vid terapije.

1.3. Nišarin

Skafold proteini (eng. *scaffolding proteins*) su važni regulatori ćelijske signalizacije i služe kao platforme koje fizički okupljaju više proteinskih partnera u specifične molekulske komplekse, čime se može povećavati efikasnost i specifičnost prenosa signala unutar ćelije (Good et al., 2011). Nišarin (eng. *nischarin*, NISCH) je opisan kao multidomenski skafold protein koji deluje kao multifunkcionalni modulator ćelijske adhezije, migracije i odgovora na signale iz mikrookruženja. Kodiran je istoimenim genom *NISCH* smeštenim na hromozomskoj lokaciji 3p21.1, u regionu koji je označen kao potencijalni klaster tumor-supresorskih gena (Loginov et al., 2008). Nišarin je prvi put identifikovan 2000. godine kao protein koji interaguje sa citoplazmatskim delom α5 integrina, čime inaktivira α5β1 integrinski kompleks i direktno reguliše integrin-posredovanu signalizaciju i ćelijsku pokretljivost (Alahari et al., 2000). Gotovo istovremeno, protein označen kao IRAS (eng. *imidazoline receptor antisera-selected protein*) je identifikovan kao kandidat za neadrenergički imidazolinski I_1-receptor, a naknadno je utvrđeno da predstavlja humani ortolog mišjeg nišarina, odnosno protein kodiran genom *NISCH* (Piletz et al., 2000). Funkcionalne studije su pokazale da ekspresija IRAS/NISCH doprinosi visokoafinitetnom vezivanju I_1-liganada i signalizaciji posredovanoj I_1-receptorima (Z. Sun et al., 2007; J. Zhang & Abdel-Rahman, 2006, 2007). Zato se danas nišarin smatra snažnim kandidatom, odnosno funkcijskom komponentom imidazolinskog I_1-receptorskog sistema za koji postoje klinički odobreni agonisti, što ga čini izuzetno zanimljivim farmakološkim ciljem u onkologiji (Bousquet et al., 2020).

1.3.1. Humane izoforme nišarina

Humani nišarin ima 4 izoforme koje nastaju procesom alternativnog spajanja primarnog transkripta (eng. *alternative splicing*). Ove izoforme se razlikuju u dužini i potencijalno u sposobnosti interakcije sa proteinima, iako njihove funkcionalne razlike još uvek nisu u potpunosti razjašnjene. Dostupni podaci baze *UniProt* ukazuju da je izoforma 1 dominantna i uzima se kao kanonska sekvenca (eng. *canonical sequence*) (https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y2I1). Zbog svoje visoke ekspresije i prisustva svih funkcionalnih domena, ona predstavlja podrazumevanu strukturu na koju se odnos istraživanja signalnih puteva nišarina. Razlike između četiri poznate izoforme proteina nišarina navedene su u Tabeli 1.1, dok je njihov šematski prikaz, sa označenim položajima funkcionalnih domena, dat na Slici 1.4. Pored molekulske mase i dužine aminokiselinskog niza, navedeni su specifični regioni koji nedostaju u kraćim varijantama, što direktno utiče na njihov potencijal za interakciju sa signalnim partnerima i subćelijsku lokalizaciju (Piletz et al., 2000; Piletz, Deleersnijder, et al., 2003).

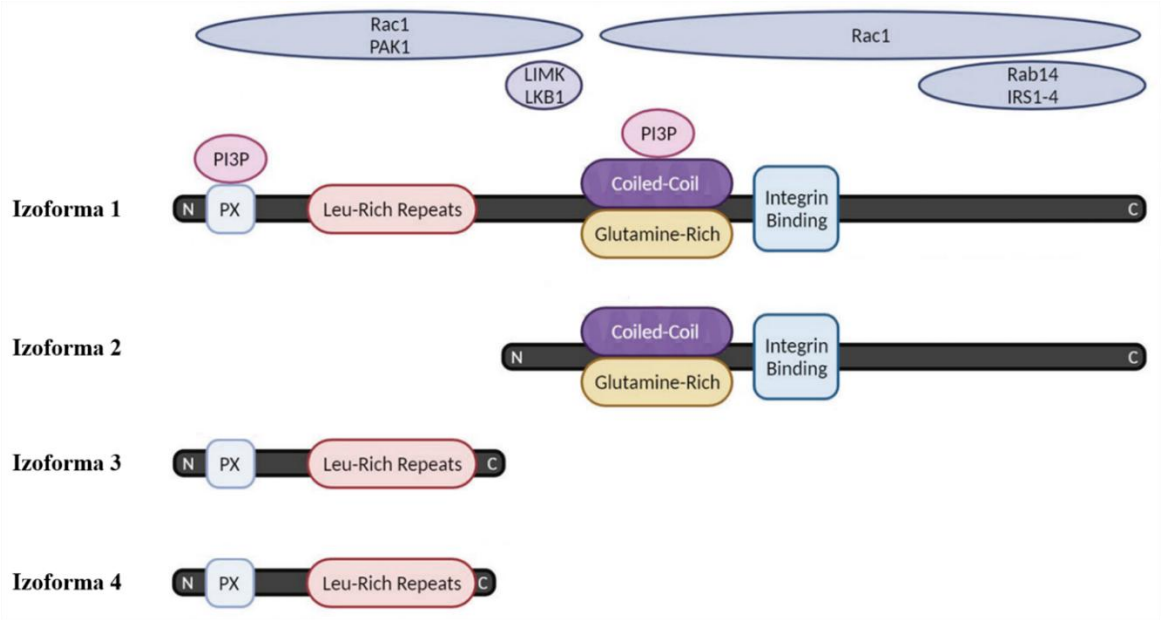
Nišarin poseduje više funkcionalnih domena i regiona koji mu omogućavaju da deluje kao signalni adaptor, integrišući signale iz mikrookruženja sa intracelularnim regulatornim putevima. Njegova struktura obuhvata terminalni PX (eng. *phox homology*) domen na amino-kraju (N-terminus), region sa ponovcima bogatim leucinom (eng. *leucine-rich repeat*, LRR), domen upredene zavojnice (eng. *coiled-coil*) i veoma dug karboksi-terminalni (C-terminalni) region.

Tabela 1.1. Strukturne i funkcionalne karakteristike izoformi humanog nišarina

Izoforma	Naziv / *UniProt* identifikator	Dužina (a.k.)	Masa (kDa)	Strukturne specifičnosti
Izoforma 1	IRAS-1, IRAS-M, Q9Y2I1-1	1504	167-190	Sadrži kompletan PX i coiled-coil domen, kao i regije za vezivanje α5 integrina.
Izoforma 2	Q9Y2I1-2	993	110	Nedostaju aminokiseline 1-511. Gubi N-terminalni deo, uključujući PX domen.
Izoforma 3	IRAS-L, Q9Y2I1-3	623	70	Nedostaju a.k. 584-1504, modifikovana sekvenca u regionu 511-583.
Izoforma 4	IRAS-S, Q9Y2I1-4			Detalji variraju u zavisnosti od baze; Piletz i sar. navode da ima samo prvih 515 aminokiselina i modifikovanu sekvencu u regionu 512-515

a.k. - amino kiselina; kDa – kilodalton.

N-terminalni PX domen nišarina ključan je za njegovo vezivanje za endozomalne membrane obogaćene fosfatidilinozitol-3-fosfatom (PI(3)P), lipidom karakterističnim prvenstveno za membrane ranih endozoma. Iako PX domen specifično prepoznaje PI(3)P, on sam nije dovoljan za efikasno usmeravanje nišarina ka endozomima, već je za njegovu pravilnu endozomalnu lokalizaciju neophodno i prisustvo *coiled-coil* regiona (Lim & Hong, 2004). Ovaj region posreduje homooligomerizaciju nišarina, tj. međusobno povezivanje više molekula nišarina, što doprinosi njegovom vezivanju za rane, sortirajuće i reciklirajuće endozome (Lim & Hong, 2004). Ovakva strukturna organizacija omogućava nišarinu da istovremeno interaguje sa aktivnim oblikom Ras-srodnog proteina Rab14 i sa PI(3)P, čime učestvuje u usmeravanju sazrevanja ranih endozoma ka Rab9- i CD63-pozitivnim kasnim endozomima (Kuijl et al., 2013). Pored uloge u vezikularnom transportu, različiti regioni nišarina predstavljaju mesta interakcije sa brojnim signalnim molekulima, poput kinaza aktiviranih proteinom p21 (eng. *p21-activated kinases*, PAK), među kojima i PAK1, LIM kinaza (eng. *LIM domain kinases*, LIMK) i komponenti integrin-signalnog kompleksa (Alahari & Nasrallah, 2004; Ding et al., 2008). Region za vezivanje integrina omogućava interakciju nišarina sa citoplazmatskim domenom α5 podjedinice integrina α5β1, čime se nišarin povezuje sa regulacijom ćelijske migracije i organizacije aktinskog citoskeleta (Alahari et al., 2000). Među njegovim interakcionim partnerima nalazi se i mala GTPaza Rac1 (eng. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). Interakcija sa Rac1 opisana je za N-terminalni i C-terminalni region nišarina, pri čemu N-terminalni region vezuje i aktivni i neaktivni oblik Rac1, dok C-terminalni region vezuje aktivni oblik (Kuijl et al., 2013). Nišarin takođe interaguje sa serin/treonin kinazom LKB1 (eng. *liver kinase B1*), a ova interakcija povezana je sa regulacijom ćelijske migracije (Jain et al., 2013). C-terminalni region nišarina učestvuje u interakciji sa proteinom Rab14 i supstratima insulinskog receptora 1, 2, 3 i 4 (eng. *insulin receptor substrates*, IRS1, IRS2, IRS3 i IRS4) (Kuijl et al., 2013; Sano et al., 2002).



Slika 1.4. Šematski prikaz izoformi nišarina sa naznačenim pozicijama funkcionalnih domena koji učestvuju u interakciji sa proteinima saradnicima. Preuzeto i adaptirano (Okpechi et al., 2022).

Razlike u domenskom sastavu mogle bi značajno da utiču na lokalizaciju i funkciju pojedinačnih izoformi nišarina. Prema šematskom prikazu na Slici 1.4, izoformi 2 nedostaje N-terminalni segment, uključujući PX domen i ponovke bogate leucinom, zbog čega se može očekivati smanjena sposobnost vezivanja za endozomalne membrane obogaćene PI(3)P, iako su *coiled-coil* i C-terminalni regioni očuvani. Izoforma 3 zadržava N-terminalne strukturne regione, uključujući PX domen i ponovke bogate leucinom, ali gubi *coiled-coil* region i najveći deo C-terminalnog dela proteina, čime se potencijalno menja njen kapacitet za formiranje kompleksnih signalnih platformi i interakciju sa proteinima uključenim u vezikularni transport i metabolizam. Izoforma 4 takođe predstavlja skraćenu varijantu koja ne sadrži *coiled-coil* region i dugi C-terminalni deo. Na osnovu ovih strukturnih razlika može se pretpostaviti da kraće izoforme imaju drugačiju distribuciju unutar ćelije i uži spektar interakcija u odnosu na kanonsku izoformu 1, ali ove funkcionalne posledice još nisu neposredno eksperimentalno potvrđene (Piletz, Deleersnijder, et al., 2003).

1.3.2. Ekspresija i fiziološke funkcije nišarina

Podaci iz baze Humani proteinski atlas (eng. *Human Protein Atlas*, HPA) pokazuju da je nišarin eksprimiran u gotovo svim ljudskim tkivima, pri čemu su najviši nivoi ekspresije zabeleženi u mozgu, zatim nadbubrežnoj žlezdi, bronhijama, rektumu, žučnoj kesi, srčanom mišiću i koži (*Tissue Expression of NISCH - Summary - The Human Protein Atlas*, n.d.). Rana istraživanja nišarina u fiziološkim uslovima primarno su bila fokusirana na nervni sistem, gde je identifikovana njegova visoka zastupljenost (Piletz et al., 2000; Piletz, Wang, et al., 2003). Pokazano je da nišarin deluje kao negativni regulator rasta neurita i migracije neurona (Ding et al., 2013, 2015).

Sledila su istraživanja na genetički modifikovanim miševima u kojima je gen *NISCH* inaktiviran (eng. *knock-out, KO*), koja su, kroz sistemske poremećaje nastale usled disfunkcije nišarina, pružila direktan uvid u kompleksnost njegove uloge u organizmu. Tako su raniji *KO* modeli otkrili ulogu nišarina u modulaciji opioidnih puteva, tako što odsustvo nišarina dovodi do povećane tolerancije i zavisnosti od morfina (F. Li et al., 2012). Gubitak nišarina delecijom egzona 4 (L. Zhang et al., 2013) ili egzona 7-10 (Dong et al., 2017) rezultuje formiranjem embriona miševa koji su značajno manji i pokazuju usporen razvoj, što sugeriše da je ovaj protein esencijalan za ranu

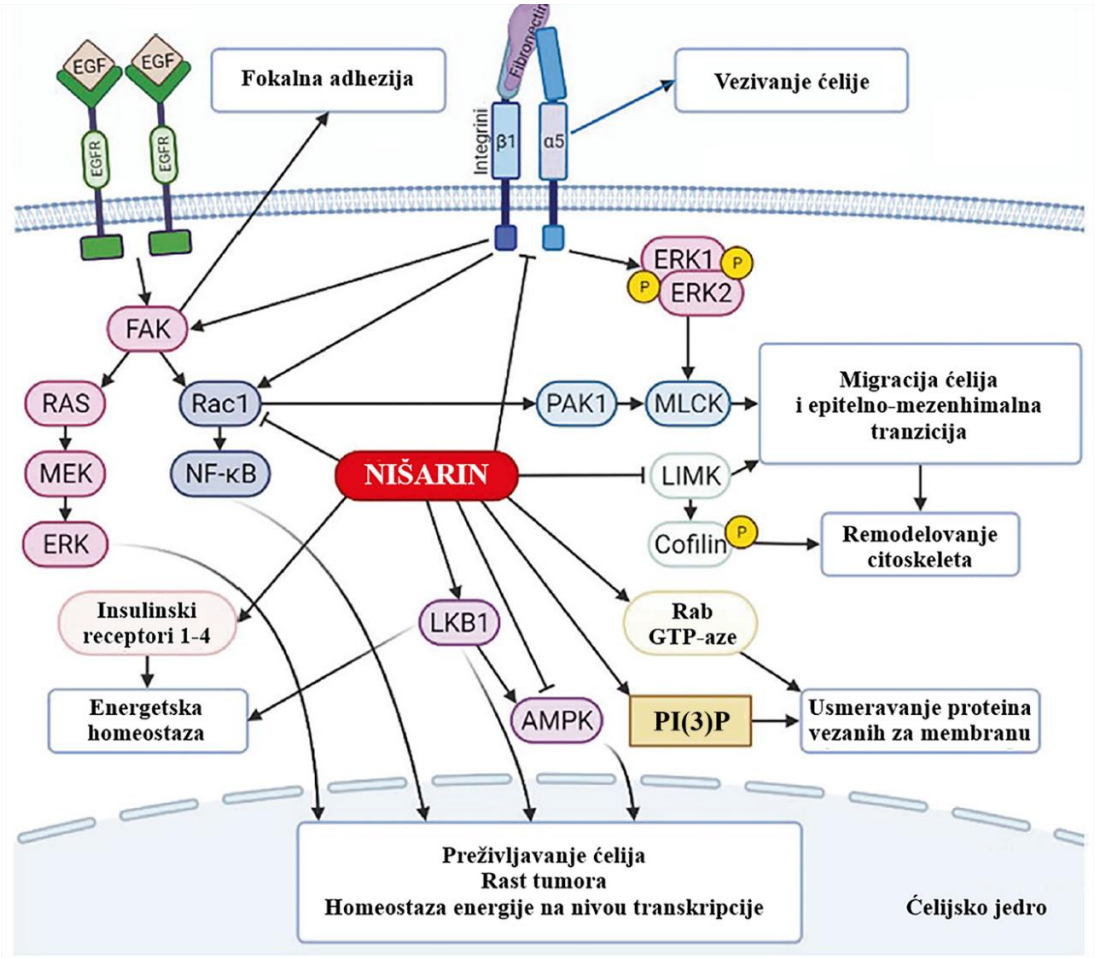
embriogenezu. Najnoviji mišji model sa delecijom egzona 5 i 6 gena *NISCH* potvrdio je da je nišarin neophodan za normalan rast jer su i embrioni i odrasle jedinke bili značajno manji u poređenju sa miševima u kojima je *NISCH* gen nepromenjen (eng. *wild-type*, WT) (Nguyen et al., 2022). Jedno od mogućih objašnjenja za manji rast miševa jeste činjenica da nišarin inhibira funkcije protein-kinaze aktivirane adenozin-monofosfatom (eng. *AMP-activated protein kinase*, AMPK), metaboličkog regulatora koji kontroliše energetsku homeostazu tako što potiskuje anaboličke i podstiče kataboličke procese (Dong et al., 2017). Ćelije kojima nedostaje nišarin takođe imaju oslabljen oksidativni metabolizam, nižu produkciju adenozin-trifosfata (ATP) i disregulaciju lipidnog metabolizma (Nguyen et al., 2022). Posebno je značajno postojanje polno specifičnog metaboličkog fenotipa kod *NISCH KO* miševa. Kod *NISCH KO* ženki zabeležena je značajna insulinska rezistencija, smanjena tolerancija na glukozu i povećana akumulacija belog masnog tkiva uz razvoj masne jetre (Dong et al., 2019). Ovi rezultati su u visokoj korelaciji sa kliničkim podacima kod ljudi, gde je nivo ekspresije gena *NISCH* obrnuto proporcionalan stepenu gojaznosti i težini poremećaja metabolizma lipida (Dong et al., 2019).

Zahvaljujući specifičnoj strukturi, nišarin interaguje sa mnogobrojnim proteinskim partnerima, čime moduliše ključne ćelijske procese kao što su adhezija i migracija, apoptoza, vezikularni transport. U fiziološkim uslovima, deluje primarno kao negativni regulator ćelijske pokretljivosti tako što, vezivanjem za citoplazmatski domen α5β1 integrina, inhibira Rac1-posredovanu reorganizaciju aktinskog citoskeleta i suprimira aktivaciju PAK signalizacije. Ovaj proces direktno ograničava formiranje lamelipodija i drugih protruzivnih struktura neophodnih za kretanje ćelije (Alahari et al., 2000; Ding et al., 2008). Pored doprinosa u održavanju stabilnosti tkivne arhitekture, nišarin utiče na ćelijsku proliferaciju i preživljavanje modulacijom ključnih signalnih kaskada, uključujući MAPK i PI3K/AKT puteve. Ipak, njegova funkcija je strogo zavisna od konteksta i varira u zavisnosti od tipa ćelije i specifičnog mikrookruženja (Alahari et al., 2004; Ostojić et al., 2024).

Iako su njegove osnovne funkcije esencijalne za normalnu ćelijsku fiziologiju, gubitak kontrole nad ovim procesima otvara put širokom spektru patoloških stanja. Dosadašnja istraživanja dovode promene u humanom *NISCH* genu u vezu sa kardiovaskularnim oboljenjima (Bousquet et al., 2020), neuropsihijatrijskim stanjima (Ding et al., 2013; Yang et al., 2023; R. Zhang et al., 2025; Zheng et al., 2023) i metaboličkim poremećajima (Dong et al., 2019). Ova funkcionalna svestranost nišarina proističe iz njegove dvostruke uloge skafold proteina i imidazolinskog I_1 receptora. Sposobnost da istovremeno reguliše metaboličku homeostazu, organizaciju citoskeleta i preživljavanje ćelija ukazuje na značaj nišarina u procesima povezanim sa onkogenezom.

1.3.3. Uloga nišarina u tumorskoj progresiji

Dosadašnja istraživanja uloge nišarina u onkogenezi primarno su sprovedena na modelima karcinoma dojke (Okpechi et al., 2022), jajnika (J. Li et al., 2015) i pluća (Krishnamurthy et al., 2019; Zhao et al., 2020), u kojima je konzistentno identifikovan kao tumor-supresor. Njegova ekspresija je značajno smanjena u tumorskim tkivima dojke i ovarijuma u poređenju sa zdravim tkivima, pri čemu nivoi nišarina dodatno opadaju tokom progresije bolesti (J. Li et al., 2015; Maziveyi & Alahari, 2015). Sa druge strane, povećanje ekspresije nišarina inhibira migraciju tumorskih ćelija *in vitro* i smanjuje rast tumora u *in vivo* modelima karcinoma dojke (Maziveyi et al., 2019).



Slika 1.5. Signalni putevi u kojima nišarin učestvuje. Nišarin funkcioniše kao kompleksni skafold protein koji integriše ekstracelularne i intracelularne signalne puteve, i na taj način reguliše citoskeletnu dinamiku, metabolički status i signalnu transdukciju ćelije. Preuzeto (Okpechi et al., 2022) uz prevod tekstualnih oznaka na srpski jezik. EGF – epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*); EGFR – receptor za EGF (eng. *epidermal growth factor receptor*); NF-κB – nuklearni faktor κB (eng. *nuclear factor kappa B*); MLCK – kinaza lakih lanaca miozina (eng. *myosin light chain kinase*).

Nišarin deluje kao negativni regulator remodelovanja citoskeleta, migracije i invazije kroz direktne i indirektne interakcije sa brojnim signalnim molekulima (Slika 1.5). Ovu funkciju primarno ostvaruje vezivanjem za citoplazmatski domen α5-integrinske podjedinice, čime moduliše intracelularni prenos signala i smanjuje integrin-zavisnu migraciju ćelija (Alahari et al., 2000). Interakcija nišarina sa integrinima i nizvodnim efektorima, kao što su Rac1 i kinaza 1 aktivirana proteinom p21 (PAK1), dovodi do inhibicije njihove aktivnosti i potiskivanja formiranja lamelipodija, čime se ograničava ćelijska pokretljivost (Alahari et al., 2004). Nedavno je pokazano da ova regulatorna funkcija nišarina može biti modulisana i oksidativnim stresom. S-glutationilacija cisteinskog ostatka Cys185 smanjuje vezivanje nišarina za Rac1 i PAK1, bez narušavanja njegove interakcije sa α5-integrinom, dok je oslobađanje Rac1 i PAK1 iz kompleksa sa nišarinom praćeno njihovom aktivacijom i promenama aktinskog citoskeleta koje pogoduju migraciji i invaziji (Shivamadhu et al., 2026).

Pored toga, nišarin funkcioniše kao negativni regulator LIM kinaze 1 (LIMK1), što rezultuje smanjenom fosforilacijom kofilina i posledičnim promenama u dinamici aktinskih filamenata (Ding et al., 2008; Jain et al., 2013). Vezivanje nišarina za α5β1 integrin dovodi i do smanjene fosforilacije FAK i ERK komponenti uključenih u formiranje fokalnih adhezija i citoskeletnu dinamiku (Baranwal et al., 2011; Maziveyi et al., 2018). Kumulativni efekat ovih procesa je destabilizacija struktura

zasnovanih na aktinu, uključujući lamelipodije i invadopodije, koje su ključne za diseminaciju tumorskih ćelija iz primarnog tumora. Dodatno je utvrđeno da je pri prekomernoj ekspresiji gena *NISCH* u ćelijama kancera dojke i ekspresija gena za E-kadherin povećana, a smanjeni nivoi transkripcionih faktora povezanih sa epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (eng. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), kao što su Snail, ZEB1 (eng. *zinc finger E-box binding homeobox 1*), Slug i Twist1, kao i mezenhimalnih markera N-kadherina i vimentina. Kako su ovi rezultati bili obrnuti kada je ekspresija gena *NISCH* bila utišana, može se zaključiti da nišarin suprimira metastatski potencijal ćelija raka dojke inhibicijom EMT procesa (Cai et al., 2020).

Nišarin takođe učestvuje i u regulaciji ćelijskog metabolizma. Dong i saradnici su pokazali da nišarin vezuje i inaktivira protein kinazu aktiviranu adenozin-monofosfatom (eng. *AMP-activated protein kinase*, AMPK), koja reguliše energetsku homeostazu inhibicijom anaboličkih i aktivacijom kataboličkih procesa (Dong et al., 2017). U istom istraživanju je pokazano da gubitak funkcije nišarina usled delecije egzona 7-10 gena *Nisch* povećava aktivaciju AMPK i smanjuje signalizaciju mehaničke mete rapamicina (eng. *mechanistic target of rapamycin*, mTOR) u mišjim embrionalnim fibroblastima, kao i u mišićnom i jetrenom tkivu (Dong et al., 2017). U drugom modelu, sa delecijom egzona 5 i 6, mišji embrionalni fibroblasti bez nišarina su pokazali smanjenu potrošnju kiseonika i niži ukupni nivo ATP-a (Nguyen et al., 2022). Za ispitivanje uloge nišarina u tumorogenezi dojke, model sa delecijom egzona 7-10 je ukršten sa MMTV-PyMT (eng. *mouse mammary tumor virus - polyoma middle T antigen*) transgenim mišjim modelom koji se najčešće koristi u istraživanju raka dojke zbog svoje sposobnosti da verno reprodukuje histološku progresiju raka dojke, razvija spontane metastaze i aktivira signalne puteve relevantne za humani karcinom dojke (Lin et al., 2003). Ukrštanjem ova dva modela je potvrđeno da gubitak funkcije nišarina drastično ubrzava rast tumora dojke i povećava njegovu metastatsku sposobnost (Dong et al., 2020). Međutim, za razliku od nalaza iz istraživanja objavljenog 2017. godine, u MMTV-PyMT modelu gubitak funkcije nišarina je doveo do smanjenja aktivnosti AMPK i njenih nizvodnih efektora (Dong et al., 2017, 2020). Ovi rezultati ukazuju na to da smer delovanja nišarina na AMPK zavisi od eksperimentalnog i biološkog konteksta i da se njegov uticaj na metaboličku signalizaciju ne može opisati jedinstvenim mehanizmom.

Navedeni mehanizmi imaju posebnu relevantnost za tumore visoke invazivnosti poput melanoma. Progresija melanoma u velikoj meri zavisi od integrinske signalizacije, pri čemu α5β1 integrinski kompleks podstiče metastaziranje kroz povećanje adhezije ćelija melanoma za fibronektin i zaštitu od apoptoze (Schaffner et al., 2013). Kako je nišarin negativni regulator signalizacije povezane sa integrinom α5β1, smanjenje njegove ekspresije u melanocitnim lezijama bi mogao doprineti povećanju migratornog i invazivnog potencijala ćelija melanoma. Ovu pretpostavku podržavaju i eksperimenti u humanim ćelijama melanoma, u kojima je povećana ekspresija nišarina smanjila aktivaciju PAK1 i ublažila efekte povećane ekspresije PAK1 na migraciju, invaziju i markere EMT procesa (Hua et al., 2024). Takođe, u ćelijama kancera dojke obnavljanje ekspresije nišarina smanjuje fosforilaciju ERK (Baranwal et al., 2011), što je posebno značajno za terapiju metastatskog melanoma budući da je reaktivacija ovog puta jedan od glavnih mehanizama stečene rezistencije na BRAF inhibitore (Shi et al., 2014; Sullivan & Flaherty, 2013).

S obzirom na to da mehaničke paralele sa drugim vrstama tumora ukazuju da gubitak nišarina stvara uslove pogodne za tumorsku progresiju melanoma kroz povećani migratorni i invazivni potencijal, metaboličku adaptaciju i fenotipsku plastičnost, nišarin se nameće kao relevantan prognostički biomarker u melanomu, kao i potencijalna meta za razvoj novih terapijskih strategija.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovna hipoteza ovog istraživanja glasi:

Ekspresija nišarina se smanjuje sa progresijom melanoma, a agonisti nišarina mogu da povrate njegovu antitumorsku funkciju u ćelijama metastatskog melanoma.

Specifične hipoteze istraživanja su:

1. Ekspresija nišarina se snižava sa progresijom melanoma usled mikrodelecija i metilacije promotora *NISCH* gena.
2. Klinički odobreni agonisti nišarina (klonidin, rilmenidin i moksonidin) ispoljavaju antitumorski potencijal na ćelijama metastatskog melanoma *in vitro*, dok na zdravim ćelijskim linijama kože ne pokazuju značajan uticaj na vijabilnost.

Cilj ove doktorske disertacije je da se ispita ekspresija, regulacija, prognostički značaj i uloga *NISCH* u melanomu, kao i potencijal njegovih agonista za prenamenu u lečenju melanoma.

Specifični ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

1. Određivanje genske i proteinske ekspresije nišarina u uzorcima pacijenata.
2. Ispitivanje regulacije ekspresije nišarina analizom metilacije promotora gena *NISCH* i genomskih mikrodelecija u uzorcima pacijenata.
3. Analiza javno dostupnih transkriptomskih podataka radi validacije dobijenih eksperimentalnih rezultata na velikim skupovima podataka, kao i ispitivanja njihove povezanosti sa kliničkopatološkim parametrima i vremenom preživljavanja, sa posebnim osvrtom na moguće razlike između muških i ženskih pacijenata.
4. Analiza genskih asocijacija radi ispitivanja povezanosti ekspresije nišarina sa signalnim putevima važnim u progresiji melanoma.
5. Ispitivanje genske i proteinske ekspresije nišarina u zdravim humanim ćelijskim linijama kože i humanim ćelijskim linijama metastatskog melanoma.
6. Ispitivanje dejstva agonista nišarina na ćelijske linije, i to uticaja na vijabilnost, ćelijski ciklus i tip ćelijske smrti, kao i promene potencijala ćelija melanoma za migraciju i invaziju usled tretmana.
7. Istraživanje molekulskih mehanizama antitumorske aktivnosti agonista nišarina *in vitro*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Analize sprovedene na parafinskim uzorcima pacijenata

3.1.1. Uzorci tkiva pacijenata

Istraživanje je sprovedeno na 33 uzorka (30 malignih i 3 benigna uzorka mladeža) tkiva pacijenata operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS) u periodu od 2015. do 2018. godine. Tkiva su radi očuvanja i dalje analize fiksirana formalinom i ukalupljena u parafin (eng. *formalin-fixed paraffin embedded*, FFPE). Svi pacijenti su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji i istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu na sednici održanoj 24. avgusta 2020. godine (Broj: 3136-01). Klinički podaci o pacijentima i patohistološke karakteristike uzoraka melanoma preuzeti su iz medicinske dokumentacije i analizirani u skladu sa standardnim kliničkim i patohistološkim protokolima.

3.1.2. Analiza ekspresije NISCH kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze

Parafinski tkivni blokovi sečeni su na mikrotomu na preseke debljine 10 µm i u proseku po tri preseka stavljana su u mikrotubu, odakle je izolovana ukupna RNK korišćenjem komercijalnog kita *RNeasy FFPE Kit* (*Qiagen*). Određivanje koncentracije i čistoće izolovane RNK vršeno je pomoću uređaja *BioSpec-nano UV-VIS Spectrophotometer* (*Shimadzu Biotech*), spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva se na osobini purinskih i pirimidinskih baza RNK da apsorbuju svetlost talasne dužine 260 nm, pri čemu je intenzitet apsorbovane svetlosti direktno proporcionalan koncentraciji RNK u rastvoru čija se apsorbancija meri. Merenjem apsorbancije na 280 nm utvrđeno je prisustvo proteina u RNK izolatu i potvrđeno da uzorci imaju zadovoljavajuću čistoću, pošto je odnos A_{260}/A_{280} bio u opsegu 1,8-2,0. Zatim je u reakciji reverzne transkripcije (RT) katalizovanoj enzimom reverzna transkriptaza, sintetisana komplementarna jednolančana DNK (eng. *complementary DNA*, cDNK) uz pomoć komercijalnog kita *RT² First Strand Kit* (*Qiagen*) prema uputstvu proizvođača.

Analiza ekspresionog profila *NISCH* gena u parafinskim uzorcima tkiva je izvršena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). To je senzitivna metoda koja omogućava preciznu kvantifikaciju ciljne sekvence u realnom vremenu, za razliku od klasične PCR reakcije koja meri proizvod samo na kraju. Reakcija sadrži fluorescentni reporter, čiji se bazalni nivo fluorescencije registruje u početnim ciklusima, a čiji intenzitet raste proporcionalno broju amplikona (PCR proizvod odgovarajuće ciljane DNK sekvence koju su prajmeri kopirali). Tokom eksponencijalne faze fluorescentni signal se brzo pojačava i instrument beleži dve vrednosti: prag (eng. *threshold*) tj. nivo fluorescencije iznad bazalnog nivoa, i Ct (eng. *threshold cycle*) vrednost, tj. ciklus u kome amplifikaciona kriva seče prag fluorescencije. Ct vrednost je obrnuto proporcionalna količini ciljne sekvence u uzorku i što je početni broj kopija veći, Ct je niži. U tu svrhu korišćen je komercijalni *Power Up SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*) koji ima fluorescentne reportere koji se direktno vezuju za dvolančanu DNK. U 20 µL finalne zapremine je dodavano po 50 ng cDNK uzoraka i 300 nM prajmera čije su sekvence navedene u Tabeli 3.1. Eksperimenti su rađeni u duplikatu na aparatu *7500 Real Time PCR System Thermocycler* (*Applied Biosystems*) pod sledećim uslovima: 2 minuta na 50 °C, 5 minuta na 95 °C, a zatim 40 sukcesivnih ciklusa denaturacije 15 sekundi na 95 °C i ekstenzije 1 minut na 60 °C. Eksperiment je nezavisno ponovljen najmanje dva puta kako bi se osigurala ponovljivost rezultata.

Tabela 3.1. Sekvence prajmera korišćenih za merenje relativne ekspresije gena *NISCH* i *ACTB* u qPCR reakciji

Gen	Prajmer	Sekvenca
NISCH	NISCHF	5′-AGTGTCCGCTTCTCAGCAAC-3′
	NISCHR	5′-AGGCTCCCACTCATCAAATTCT-3′
ACTB	ACTBF	5′-TCTGGCACCACACCTTCTAC-3′
	ACTBR	5′-GATAGCACAGCCTGGATAGC-3′

Ekspresija *NISCH* gena je normalizovana u odnosu na referentni gen (eng. *housekeeping gene*) *ACTB*, koji kodira β-aktin, i preračunata je na osnovu komparativne ΔΔCt metode koju su definisali Livak i Schmittgen (Livak i Schmittgen, 2001) na sledeći način:

$$\Delta Ct \text{ (uzorka)} = Ct \text{ (}NISCH\text{)} - Ct \text{ (}ACTB\text{)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (uzorka)} - \Delta Ct \text{ (referentnog uzorka mladeža)}$$

$$\text{Relativna ekspresija} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ova vrednost koristi se za poređenje nivoa relativne genske ekspresije između uzoraka.

Zbog visokog sadržaja melanina, nije bilo moguće izmeriti nivoe genske ekspresije u tri uzorka (uzorci broj 1, 8 i 20), kao ni u uzorcima 16, 21, 23, 30 i u uzorku nevusa N1 zbog slabog kvaliteta izolovane RNK iz FFPE isečaka. Posle kontrole kvaliteta, 2 nevusa, 8 primarnih tumora, 10 metastaza iz limfnih čvorova i 5 udaljenih metastaza su korišćeni za dalju analizu.

3.1.3. Imunohistohemijsko bojenje

Parafinski tkivni blokovi su rutinski isečeni mikrotomom na preseke debljine 5 μm, koji su zatim postavljeni na čista visokoadherentna predmetna stakla. Preseci su deparafinisani i rehidrirani kroz dve promene ksilola (rastvara parafin), seriju alkohola opadajuće koncentracije 100-70 % (postepeno vraćaju tkivo iz hidrofobnog u vodeno okruženje) i, na kraju, vodu.

Hematoksilin-eozin bojenje (H&E) je iskorišćeno za analizu strukture tkiva, odnosno histoloških promena. Nukleusi ćelija (DNK) bojena su u plavo-ljubičasto Majerovim rastvorom hematoksilina (*Sigma-Aldrich*) tokom petominutne inkubacije, nakon čega su pločice dobro isprane vodom. Zatim su citoplazma, kolagen, mišićna vlakna i eritrociti bojeni u roze 2 % eozinom (*Sigma-Aldrich*). Nakon toga su obojeni preseci tkiva dehidrirani kroz dve promene 70 %, 95 % i apsolutnog etanola, pročišćeni u ksilolu i montirani u kanadskom balzamu (*Sigma-Aldrich*).

Formalinska fiksacija većine tkiva dovodi do unakrsnog povezivanja proteina i formiranja metilenskih mostova čime se čuva morfologija ćelija i sprečava razgradnja proteina, ali se na taj način mogu maskirati i antigenska mesta. Zato je pre imunohistohemijskog bojenja urađeno toplotno demaskiranje antigena tako što su tkivni preseci stavljeni u citratni pufer i termički obrađeni u mikrotalasnoj pećnici. Nakon toga je usledilo blokiranje endogene peroksidaze potapanjem u smešu 3 % vodonik-peroksida (H_2O_2) i blokiranje nespecifičnog vezivanja inkubacijom uzoraka sa serumom. Uzorci su zatim preko noći inkubirani na 4 °C sa specifičnim primarnim antitelima koja se vezuju za antigen od interesa:

- mišje monoklonsko anti-vimentin antitelo, klon V9, razblaženje 1:100 (#MS-129, Thermo Lab Vision),
- mišje monoklonsko anti-nišarin antitelo, razblaženje 1:300 (#558262, BD Biosciences).

Sutradan je usledilo ispiranje viška primarnog antitela fosfatno puferisanim fiziološkim rastvorom (eng. *phosphate-buffered saline*, PBS) i vizualizuja pomoću sekundarnih antitela obeleženih hromogenom. Za detekciju vimentina i nišarina, korišćen je sekundarni detekcioni sistem zasnovan na imunoperoksidazi (eng. *Immunoperoxidase Secondary Detection System; Merck Millipore*) namenjen za detekciju mišjih ili zečjih antitela klase imunoglobulina G (IgG) pomoću kompleksa biotin-streptavidin-peroksidaza rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP). Nakon vezivanja primarnog antitela za ciljni antigen i ispiranja viška, naneto je biotinom obeleženo sekundarno antitelo, koje se vezuje za primarno antitelo. Nakon ispiranja preostalog nevezanog sekundarnog antitela, dodat je streptavidin-HRP konjugat koji se vezuje za biotin na sekundarnom antitelu. Vizualizacija je izvršena primenom hromogena 3,3′-diaminobenzidina (DAB), pri čemu reakcija sa peroksidazom u prisustvu vodonik-peroksida dovodi do stvaranja nerastvornog braon taloga na mestima prisustva antigena. Uzorci su posmatrani objektivom uvećanja 20× na mikroskopu Zeiss Axio Observer, a finalne mikrografije su snimljene pomoću softvera AxioVision SE64 (Zeiss, Nemačka).

3.1.4. Analiza genomskih mikrodelecija

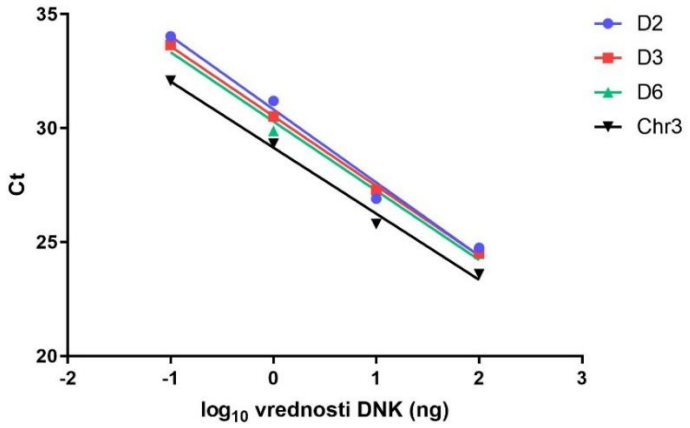
Za izolaciju genomske DNK iz isečaka parafinskih uzoraka tkiva korišćen je komercijalni kit *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (*Qiagen*) prema uputstvu proizvođača. Kao interna kontrola za detekciju mikrodelecija korišćena je DNK izolovana iz perifernih limfocita zdravog donora. Limfociti su odabrani jer u zdravim osobama imaju genomski stabilnu DNK, bez očekivanih mikrodelecija, što omogućava pouzdanu normalizaciju i potvrdu efikasnosti PCR reakcije. Merenje koncentracije i kvaliteta izolovane DNK rađeno je na *BioSpec-nano UV-VIS* spektrofotometru (*Shimadzu Biotech*). Odnos $A_{260/A280}$ vrednosti je iznosio između 1,7-2,0 što ukazuje da nije bilo kontaminacije proteinima, a odnos $A_{260/A230}$ je bio ≥1,8, što je potvrdilo kvalitet izolovane DNK jer niže vrednosti ukazuju na prisustvo organskih komponenti.

Za qPCR je korišćen *Power Up SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*) sa po 20 ng DNA i 300 nM prajmerima (Baranwal et al., 2011) u 20 µL finalne zapremine. Eksperimenti su rađeni u duplikatu na aparatu *7500 Real Time PCR System Thermocycler* (*Applied Biosystems*) pod sledećim uslovima: 2 minuta na 50 °C, 2 minuta na 95 °C, a zatim 45 ciklusa denaturacije 15 sekundi na 95 °C i ekstenzije 1 minut na 60 °C. Tri seta specifičnih prajmera (Tabela 3.2), koje su Baranwal i koautori (Baranwal et al., 2011) dizajnirali, amplifikuju različite regije unutar *NISCH* gena koje su podložne mikrodelecijama. Kao interna PCR kontrola korišćena je konzervativna regija hromozoma 3 (amplifikovana Chr3 prajmerima), koja predstavlja stabilan region bez čestih strukturnih varijacija poput mikrodelecija u opštoj populaciji, pa se signal očekuje u svim normalnim uzorcima (Schøler et al., 2017).

Tabela 3.2. Sekvence prajmera korišćene za genomski qPCR

Gen	Prajmer	Sekvenca
NISCH	D2F	5′-TGGACACTTATACGGTGTGTTGGG-3′
	D2R	5′-TCCTCGCAATCGCAGACCCTTCTA-3′
	D3F	5′-TACAGCGACTTCCATGACCTGCAT-3′
	D3R	5′-ACAATGGAAAGTTGGCCTACGGGT-3′
	D6F	5′-TGGCAAGAGCTTTGAAGATGCCC-3′
	D6R	5′-TTGGCATCGCAAACCAAAGAGTCC-3′
Chr3	Chr3F	5′-CTAGAAGATCTACCTCCAAGAGG-3′
	Chr3R	5′-CCAGGCTGAAGCTATTCCAG-3′

Za prajmere specifične za regione u genu nišarina i hromozoma 3, generisane su standardne krive korišćenjem serije desetostrukih razblaženja u opsegu od 0,1 do 100 ng. Vrednosti nagiba krivih su izračunate pomoću *GraphPad Prism* v8.0.1 softvera (Slika 3.1, Tabela 3.3).



Slika 3.1. Standardne krive za prajmere specifične za regione gena *NISCH* i hromozoma 3. Standardne krive generisane su korišćenjem serije desetostrukih razblaženja DNK.

Tabela 3.3. Parametri linearne regresije standardnih krivih za prajmere specifične za regione gena *NISCH* i hromozoma 3

	Nagib	SE nagiba	95 % CI nagiba	R^2	P (F-test)
D2	-3,211	0,2770	-4,403 do -2,019	0,9853	0,0074
D3	-3,060	0,07066	-3,364 do -2,756	0,9989	0,0005
D6	-3,038	0,1997	-3,897 do -2,179	0,9914	0,0043
Chr3	-2,899	0,1708	-3,634 do -2,164	0,9931	0,0035

SE – standardna greška (eng. *standard error*); CI – interval poverenja (eng. *confidence interval*); R^2 – koeficijent determinacije; P vrednost < 0,05 označava statističku značajnost regresionog modela utvrđenu F-testom.

Normalizacija podataka i preračunavanje broja kopija gena su izvedeni kao što je prethodno opisano (Weksberg et al., 2005):

$$KCt = \left(\frac{ACt_R - Ct_R}{S_R} \right) \times S_T + Ct_T$$

KCt = Korigovana Ct vrednost test prajmera (T) u odnosu na referentni prajmer (R) u istom uzorku
ACt_R = Prosečna Ct vrednost referentne sekvence za sve uzorke u jednom qPCR eksperimentu (kontrole + pacijenti)
Ct_R = Ct vrednost referentne sekvence za uzorak koji se koriguje
S_R = Nagib standardne krive za referentnu sekvencu (Chr3)
S_T = Nagib standardne krive za test sekvencu (D2, D3 ili D6 region *NISCH* gena)
Ct_T = Ct vrednost testirane sekvence *NISCH* gena za uzorak koji se koriguje

$$\Delta KCt = KCt_{kontrola} - KCt_{test}$$

ΔKCt = promena broja kopija sekvence u testiranom uzorku u poređenju sa kontrolnim uzorkom

$KCt_{kontrola}$ = korigovana Ct vrednost test sekvence u kontrolnom uzorku (limfocitima zdravog donora)

KCt_{test} = korigovana Ct vrednost test sekvence u ispitivanom uzorku (mladežima i uzorcima melanoma)

Ukratko, Ct vrednosti uzoraka za svaki set prajmera koji amplifikuju različite regije unutar *NISCH* gena su normalizovane u odnosu na Ct vrednost Chr3 proizvoda iz istog uzorka kako bi se uklonile varijacije između uzoraka i eksperimenata, uzimajući u obzir prosečne Ct vrednosti Chr3 za celu grupu uzoraka i nagibe standardnih krivih (oslikavaju efikasnost amplifikacije prajmera). Tako dobijene korigovane Ct vrednosti (KCt) svakog uzorka koji se ispituje su oduzimane od KCt vrednosti koja je dobijena za uzorak limfocita, koji predstavljaju kontrolni uzorak. Ako je razlika (ΔKCt) između uzorka limfocita zdravog donora i uzorka mladeža ili melanoma bila manja od −0,35, to se smatralo indikatorom mikrodelecije, dok je razlika u opsegu od −0,35 do +0,35 smatrana indikatorom odsustva delecije u testiranom regionu. Uzorak je smatran pozitivnim za mikrodelecije ako je bar jedan set prajmera indikovao mikrodelecije.

3.1.5. Metilaciono specifični PCR

Hipermetilacija predstavlja povećano dodavanje metil-grupa na citidin u dinukleotidima citidin-fosfat-guanin (CpG) i jedna je od ključnih epigenetskih modifikacija koja može dovesti do smanjenja ili potpunog gubitka ekspresije gena. Promene u metilaciji posebno su značajne u regulatornim regionima gena, kao što su promotori, jer modifikuju pristup transkripcijskim faktorima i RNK polimerazi, čime direktno utiču na uključivanje ili isključivanje gena.

Za analizu metilacije DNK, prethodno izolovana DNK je najpre podvrgnuta bisulfitnoj konverziji sa komercijalnim setom *EZ DNA Methylation-Direct Kit* (*Zymo Research*) prema protokolu koji je propisao proizvođač. Tokom bisulfitne konverzije, nemetilovani citozini se hemijski modifikuju u uracil, koji se tokom PCR amplifikacije očitava kao timin. Nasuprot tome, metilovani citozini ostaju neizmenjeni. Ova razlika omogućava razlikovanje metilovanih i nemetilovanih sekvenci istog DNK regiona na osnovu promena u nukleotidnom sastavu. Potpuno metilovana DNK je korišćena kao pozitivna kontrola (*Human Methylated DNA, Zymo Research*), a PCR-amplifikovana nemetilovana DNK je korišćena kao negativna kontrola. Za PCR reakciju korišćen je *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* (*Applied Biosystems*) sa po 25 ng bisulfitski konvertovane DNK uzoraka i 300 nM prajmerima (Ostrow et al., 2010) u konačnoj zapremini reakcije od 20 µL. Analiza je sprovedena na *ProFlex PCR* sistemu pod sledećim uslovima: inicijalna aktivacija enzima trajala je 5 minuta na 95 °C, nakon čega je sledilo 40 ciklusa amplifikacije (95 °C 30 s, 60/56 °C 45s, 72 °C 45 s), pri čemu je temperatura vezivanja prajmera (eng. *annealing*) iznosila 60 °C za *ACTB*, odnosno 56 °C za *NISCH*, i 10 minuta ekstenzije 45 sekundi na 72 °C (optimalna temperatura za aktivnost AmpliTaq Gold DNK polimeraze). PCR produkti su vizualizovani na aparatu *Agilent 2100 Bioanalyzer* po principu klasične gel elektroforeze, ali u mikrofluidnom čipu (*DNA 1000 LabChip, Agilent Technologies*). Nakon nanošenja uzoraka i markera u bunariće na čipu, primenjuje se električno polje koje omogućava razdvajanje DNK fragmenata prema dužini, pri čemu kraći fragmenti migriraju brže. DNK se detektuje putem laserom indukovane fluorescencije, a rezultati se prikazuju kao virtuelne gel slike ili elektroferogrami. Na osnovu migracionog vremena u poređenju sa markerima poznate dužine određuje se veličina fragmenata, dok se koncentracija uzorka procenjuje u odnosu na gornji dužinski marker.

Relativni nivo metilacije promotora *NISCH* gena izračunat je kao odnos kvantifikovanog metilovanog *NISCH* u odnosu na referentni gen *ACTB*, pomnožen sa 1000 radi lakšeg prikaza. Kao granična vrednost (eng. cut-off) uzeta je srednja vrednost nivoa metilacije izmerene u mladežima,

dok je opseg srednja vrednost ± standardna devijacija (eng. *standard deviation*, SD) smatran zonom nesigurnosti. Uzorci sa relativnim nivoom metilacije višim od srednje vrednosti uvećane za jednu standardnu devijaciju klasifikovani su kao hipermetilovani u poređenju sa benignim tkivom.

Tabela 3.4. Sekvence prajmera korišćene za metilaciono specifični PCR

Gen	Naziv prajmera	Sekvenca
NISCH	mNISCHF	5′-TTTTTTTCGTATAGAGTTCGT-3′
	mNISCHR	5′-CTAAACCTCTCTAAAATTCG-3′
ACTB	mACTBF	5′-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3′
	mACTBR	5′-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3′

3.2. Bioinformatičke analize javno dostupnih podataka

3.2.1. Preuzimanje i obrada podataka o ekspresiji gena NISCH i pratećim kliničkopatološkim karakteristikama

Kako bi se validirali eksperimentalno dobijene rezultate, promene nivoa ekspresije *NISCH* gena tokom progresije melanoma su dodatno analizirane korišćenjem javno dostupnih baza podataka. Dva seta podataka su preuzeta iz GEO (eng. *Gene Expression Omnibus*) baze podataka Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*): GSE3189 i GSE46517. Skup GSE3189 obuhvatao je 7 uzoraka normalne kože, 18 benignih melanocitnih nevusa i 45 uzoraka primarnog melanoma, a ekspresija gena određena je pomoću mikročipa *Affymetrix Human Genome U133A Array*, označenog kao platforma *GPL96* (Talantov et al., 2005). Skup podataka GSE46517 obuhvatao je ukupno 121 uzorak analiziran pomoću iste mikročipovske platforme, ali za potrebe ovog istraživanja uključeno je samo 99 uzoraka sa Medicinskog univerziteta u Beču za koje su bili dostupni klinički podaci: 7 uzoraka normalne kože, 9 nevusa, 31 uzorak primarnog melanoma i 52 uzorka metastatskog melanoma (Kabbarah et al., 2010). Ekspresione matrice oba skupa podataka su preuzete iz GEO baze u prethodno obrađenom (eng. *preprocessed*) obliku.

Kako bi se eliminisao problem višestrukih skupova proba (eng. *probe sets*) koje mapiraju iste gene na mikročipovskoj platformi *GPL96*, ekspresione matrice učitane su u program GSEA (eng. *Gene Set Enrichment Analysis, Broad Institute*) Desktop, verzija 4.1.0, gde su podaci svedeni sa nivoa proba na nivo genskih simbola. Ovaj proces je izvršen korišćenjem odgovarajuće anotacione datoteke za platformu GPL96 i metode *Max_probe*, čime je za svaki gen i svaki uzorak zadržana najveća ekspresiona vrednost među skupovima proba koji su se mapirali na isti genski simbol. Dobijene su jedinstvene vrednosti ekspresije *NISCH*, kao i ostalih gena, koje su korišćene u daljim analizama.

Dodatno su analizirani i podaci iz projekta *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) za kožni melanom (eng. *skin cutaneous melanoma*, SKCM), iz kohorte *Genome Data Analysis Center* (GDAC) *Firehose Legacy* Instituta Broad (https://doi.org/10.7908/C11G0KM9), korišćenjem veb bioinformatičkog alata cBioPortal (https://www.cbioportal.org/) (Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013). Normalizovani transkriptomski skup podataka koji obuhvata 472 uzorka preuzet je sa ove platforme radi dalje analize. S obzirom na to da su TCGA SKCM i GSE46517 sadržali kliničke i patohistološke podatke o pacijentima i uzorcima, ovi skupovi podataka su dodatno analizirani kako bi se ispitala moguća povezanost ekspresije *NISCH* gena sa kliničkopatološkim parametrima.

3.2.2. *Analiza ekspresije nišarina – Humani proteinski atlas*

Interaktivna veb-platforma Humani proteinski atlas (HPA) korišćena je za ispitivanje nivoa ekspresije gena i proteina nišarina u uzorcima kože i melanoma, kao i njihove subćelijske lokalizacije u normalnim i tumorskim ćelijama. HPA predstavlja javno dostupnu bazu podataka koja objedinjuje transkriptomske podatke, rezultate imunohistohemijskog bojenja i informacije o lokalizaciji proteina u različitim ljudskim tkivima, tumorima i ćelijskim linijama. Podaci o ekspresiji nišarina u normalnoj koži analizirani su u okviru odeljka *Tissue Atlas* (https://v21.proteinatlas.org/ENSG00000010322-NISCH/tissue/skin) (Uhlén et al., 2015), dok su podaci koji se odnose na melanom preuzeti iz odeljka *Pathology Atlas* (https://v21.proteinatlas.org/ENSG00000010322-NISCH/pathology/melanoma) (Uhlen et al., 2017).

3.2.3. *Ekspresija transkripata i zastupljenost izoformi gena NISCH*

Za analizu ekspresije i relativne zastupljenosti transkripata gena *NISCH* u uzorcima melanoma i normalnog tkiva kože, korišćena je interaktivna veb-platforma GEPIA2 (eng. *Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2*) (Tang et al., 2019). Ova platforma objedinjuje podatke dobijene sekvenciranjem RNK iz 9.736 tumorskih i 8.587 normalnih uzoraka iz projekata TCGA i *Genotype-Tissue Expression* (GTEx), obrađene primenom standardizovanih bioinformatičkih postupaka (Tang et al., 2019). Identifikovani su protein-kodirajući transkripti gena *NISCH* i utvrđene razlike u njihovoj ekspresiji između 461 uzorka melanoma i 558 uzoraka zdravog tkiva kože primenom standardnih podešavanja platforme. Za utvrđivanje diferencijalne ekspresije korišćen je bioinformatički metod *limma*, uz definisani prag statističke značajnosti $P < 0{,}01$ i prag apsolutne vrednosti logaritamski transformisanog faktora promene (eng. *Fold Change*, FC) ekspresije $|\log_2 FC| \geq 1$. Vrednosti ekspresije, izražene kao broj transkripata na milion očitavanja (eng. *transcripts per million*, TPM), preuzete su sa platforme, a za potrebe grafičkog prikaza logaritamski su transformisane prema formuli $\log_2(TPM + 1)$ radi preglednijeg prikazivanja podataka.

3.2.4. *Metilacioni status promotorskog regiona gena NISCH*

U normalnim ćelijama, CpG ostrvca smeštena u promotorskim regionima gena su uglavnom nemetilovana, što pogoduje vezivanje transkripcionih faktora i stvaranju uslova za aktivnu transkripciju gena (Deaton & Bird, 2011). Promene u metilaciji ovih regiona mogu dovesti do poremećaja ekspresije gena i doprineti nastanku različitih bolesti, uključujući kancer. Hipermetilacija promotorskih CpG ostrvaca najčešće je povezana sa smanjenom transkripcijom odgovarajućeg gena i predstavlja jednu od karakterističnih epigenetičkih promena u malignim ćelijama (Baylin & Jones, 2016).

Za analizu metilacionog statusa promotorskog regiona gena *NISCH* korišćeni su javno dostupni podaci iz skupova TCGA SKCM i GSE86355 (J. Wouters et al., 2017). Preprocesirane vrednosti metilacije za uzorke iz skupa TCGA SKCM preuzete su pomoću interaktivne veb-platforme MEXPRESS (https://mexpress.be), koja omogućava integrisani prikaz metilacije pojedinačnih CpG mesta, ekspresije gena i kliničkih karakteristika uzoraka (Koch et al., 2015, 2019). Dodatno, iz GEO baze je preuzet skup podataka GSE86355, koji sadrži informacije o statusu metilacije u 75 uzoraka, uključujući 14 benignih melanocitnih nevusa, 33 primarna melanoma i 28 metastatskih melanoma. Metilacioni profili u ovom skupu određeni su pomoću platforme *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (J. Wouters et al., 2017).

Nivo metilacije prikazan je pomoću β-vrednosti koje se kreću od 0, što odgovara veoma niskom nivou metilacije, do 1, što odgovara visokom nivou metilacije. Za svaki uzorak izračunata je srednja β-vrednost odabranih CpG proba koje se, prema anotaciji platforme, nalaze unutar CpG ostrvaca u regionu TSS1500 gena *NISCH*, odnosno između 200 i 1500 baznih parova uzvodno od početnog

mesta transkripcije (eng. *transcription start site*, TSS). U okviru skupa TCGA SKCM kao referentna vrednost je korišćena srednja β-vrednost dva dostupna uzorka normalne kože, dok je u skupu GSE86355 kao referentna vrednost korišćena srednja β-vrednost 14 benignih melanocitnih nevusa. Na grafičkim prikazima referentna srednja vrednost označena je crvenom horizontalnom linijom, dok je osenčeni opseg koji obuhvata srednju vrednost ± jednu standardnu devijaciju referentne grupe, smatran je zonom nesigurnosti, tj. neodređenog metilacionog statusa. Vrednosti iznad gornje granice referentnog opsega operativno su označene kao povišeno metilovane, a vrednosti ispod njegove donje granice kao manje metilovane u odnosu na referentnu grupu.

3.2.5. Somatske promene

Promene u broju kopija DNK (eng. *copy number alterations, CNA*) predstavljaju somatske genomske aberacije nastale gubitkom ili umnožavanjem određenih segmenata DNK u odnosu na normalno prisustvo dve kopije gena, koje se naziva diploidno stanje. U okviru platforme cBioPortal promene broja kopija su prikazane vrednostima −2, −1, 0, +1 i +2. Vrednost −2 označava duboku deleciju, koja može odgovarati homozigotnom gubitku gena (gubitak obe kopije gena), dok vrednost −1 označava plitku deleciju, koja može odgovarati gubitku jedne kopije gena (tzv. heterozigotna delecija). Vrednost 0 označava diploidno stanje, +1 dobitak niskog nivoa (obično jedna dodatna kopija), a +2 amplifikaciju visokog nivoa (višestruko povećanje broja kopija određenog genomskog regiona). Budući da su ove kategorije određene bioinformatičkim algoritmima i zavise od čistoće i ploidije (broj hromozoma u ćelijama) tumorskog uzorka, one predstavljaju procenjene, odnosno putativne promene broja kopija.

Somatske mutacije predstavljaju trajne promene u sekvenci DNK koje nastaju tokom života u somatskim ćelijama, odnosno ćelijama koje ne pripadaju germinativnoj liniji, i po pravilu se ne prenose na potomstvo (Martincorena & Campbell, 2015). Mogu nastati usled grešaka tokom replikacije DNK i ćelijske deobe ili delovanjem spoljašnjih mutagenih faktora kao što su UV zračenje i određene hemijske supstance (Stratton et al., 2009). U zavisnosti od vrste i položaja promene, somatske mutacije mogu uticati na ekspresiju gena i strukturu ili funkciju odgovarajućeg proteina, ali mogu biti i bez jasno utvrđenog funkcionalnog značaja (Vogelstein et al., 2013).

Za analizu somatskih promena gena *NISCH* u uzorcima metastatskog melanoma korišćena je javno dostupna platforma cBioPortal koja omogućava integrisano pretraživanje, vizuelizaciju i analizu različitih tipova genomskih i kliničkih podataka iz tumorskih uzoraka (Cerami et al., 2012; J. Gao et al., 2013). Preuzeti su skupovi podataka TCGA SKCM *Firehose Legacy* (https://doi.org/10.7908/C11G0KM9) i DFCI (eng. *Dana-Farber Cancer Institute*) (Liu et al., 2019), koji sadrže informacije o somatskim promenama u broju kopija, kao i kompletne podatke o genetskom i mutacionom statusu *NISCH* gena. Preuzeti podaci su obrađeni i grafički prikazani pomoću programa GraphPad Prism.

3.2.6. Analiza preživljavanja

Za analizu ukupnog preživljavanja pacijenata (eng. *overall survival*, OS) korišćeni su podaci o ekspresiji gena *NISCH* i odgovarajući klinički podaci za 102 uzorka primarnih melanoma iz kohorte TCGA SKCM, koji su preuzeti iz *Human Protein Atlas* baze, verzija 21 (https://v21.proteinatlas.org/ENSG00000010322-NISCH/pathology/melanoma) (Uhlen et al., 2017). Vrednosti ekspresije gena bile su izražene kao broj fragmenata po kilobazi transkripta na milion mapiranih očitavanja (eng. *fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*, FPKM). Pacijenti su podeljeni u grupe sa visokom i niskom ekspresijom gena *NISCH* primenom najbolje granične vrednosti (eng. *best cut-off*) koja je definisana kao vrednost ekspresije koja je omogućila najveće razdvajanje Kaplan-Majerovih krivih, odnosno dala najnižu *p*-vrednost log-rank testa.

Analiza je sprovedena za celokupnu kohortu, kao i zasebno za podgrupe u kojima su pacijenti podeljeni prema polu.

Kao dodatni skup podataka, iz GEO baze je preuzet i analiziran set GSE46517 koji obuhvata 31 uzorak primarnog melanoma obrađen pomoću platforme *Affymetrix Human Genome U133A Array* (Kabbarah et al., 2010). Uzorci za koje su bili dostupni podaci o ekspresiji gena *NISCH* i kliničkom praćenju, podeljeni su u grupe sa visokom i niskom ekspresijom prema medijani ekspresije. Medijana je odabrana kao unapred definisana granična vrednost radi formiranja grupa sa približno jednakim brojem uzoraka da bi se smanjio rizik od prenaglašavanja razlika usled određivanja optimalne granične vrednosti u malom skupu uzoraka.

Verovatnoća ukupnog preživljavanja procenjena je Kaplan-Majerovom metodom (Kaplan & Meier, 1958), dok su razlike između grupa ispitane log-rank testom u programu GraphPad Prism. Pacijenti koji su bili živi u vreme poslednjeg dostupnog praćenja tretirani su kao cenzurisani podaci.

3.2.7. Analiza obogaćenja genskih skupova

Uzorci primarnih melanoma iz skupova podataka GSE46517 i TCGA SKCM podeljeni su prema polu pacijenata, nakon čega je analiza obogaćenja genskih skupova (eng. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) sprovedena zasebno u podgrupama pacijentkinja i pacijenata. Analiza je izvršena pomoću programa GSEA, verzije 4.1.0 (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005), korišćenjem unapred definisanih genskih skupova iz *Molecular Signatures Database* (MSigDB; verzija 7.5.1), baze genskih skupova razvijene za funkcionalnu interpretaciju podataka visoke propusnosti i GSEA analizu (Liberzon et al., 2011). Kao primarna kolekcija korišćeni su *Hallmark* genski skupovi, koji predstavljaju sažete genske potpise definisanih bioloških stanja i procesa (Liberzon et al., 2015). Dodatni signalni i metabolički putevi su analizirani korišćenjem kolekcija Kjotske enciklopedije gena i genoma (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG) i *Reactome*, verzije 2022. Cilj analize bio je identifikovanje bioloških procesa i signalnih puteva čija je aktivnost povezana sa ekspresijom gena *NISCH*. Ekspresioni profil gena *NISCH* definisan je kao kontinuirani fenotip, bez podele uzoraka na grupe sa visokom i niskom ekspresijom. Za svaki gen izračunat je Pirsonov koeficijent korelacije (eng. *Pearson correlation coefficient*) između njegove ekspresije i ekspresije gena *NISCH* u analiziranim uzorcima, a dobijene vrednosti korišćene su za rangiranje gena od pozitivno do negativno korelisanih. Statistička značajnost obogaćenja procenjena je na osnovu 1.000 permutacija fenotipa. Genski skupovi sa nominalnom *P*-vrednošću < 0,05 i stopom lažnih otkrića (eng. *false discovery rate,* FDR) q-vrednošću < 0,25 smatrani su statistički značajno obogaćenim. Ove vrednosti se standardno koriste u GSEA kao eksploratorni kriterijum za identifikovanje potencijalno značajnih bioloških obrazaca (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005). Smer povezanosti genskog skupa sa ekspresijom gena *NISCH* određen je na osnovu normalizovanog skora obogaćenja (eng. *normalized enrichment score*, NES). Pozitivna NES vrednost označavala je obogaćenje među genima pozitivno povezanim sa ekspresijom gena *NISCH*, dok je negativna NES vrednost označavala obogaćenje među negativno povezanim genima.

3.3. Eksperimenti izvedeni u ćelijskoj kulturi

3.3.1. Ćelijske linije

Antiproliferativni potencijal agonista nišarina je ispitan na panelu humanih tumorskih ćelijskih linija melanoma: A375, HTB-140, 518a2 i FemX-I (Tabela 3.5). Dodatno je testirana i A375R, sublinija rezistentna na vemurafenib, razvijena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije kontinuiranim izlaganjem roditeljskih A375 ćelija postepeno rastućim koncentracijama vemurafeniba (Z. Gao et al., 2015). Kao netumorske kontrole korišćeni su humani dermalni fibroblasti i spontano

imortalizovana humana ćelijska linija keratinocita HaCaT. Sve ćelijske linije, osim dermalnih fibroblasta i A375R, poticale su iz kolekcije ćelijskih linija Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, poreklom iz *American Type Culture Collection* (ATCC, USA) ili su dobijene ljubaznošću saradnika iz drugih laboratorija. Osnovne karakteristike ćelijskih linija melanoma su prikazane u Tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Karakteristike humanih ćelija melanoma korišćenih u ovom istraživanju.

Ćelijska linija/ Karakteristike	A375 (A-375)	HTB-140 (Hs 294T)	518a2 (518A2)	FemX-I (FEMX)
Morfologija[1]	Epiteloidna / Poligonalna sa vretenastim subpopulacijama	Mešovita zvezdasta i poligonalna	Vretenasta / Fibroblastoidna	Poligonalna do vretenasta
Poreklo tumora/ metastaza	Primarni tumor kože	Metastaza u limfnom čvoru	Metastaza nepoznate lokalizacije	Metastaza u limfnom čvoru
BRAF status[2]	Homozigot (*V600E* mutacija)	Heterozigot (*V600E* mutacija)	Homozigot (*V600E* mutacija)	WT

[1]Morfološke karakteristike zavise od gustine ćelija, broja pasaža i uslova gajenja.
[2]Heterozigotna mutacija označava prisustvo varijante *V600E* na jednom alelu, homozigotna na oba alela gena, dok WT označava odsustvo mutacije.

Ćelijske linije melanoma, kao i ćelije HaCaT, gajene su u hranljivoj podlozi RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute 1640*, *Sigma-Aldrich*), koja sadrži 2 g/L glukoze. Podloga je suplementirana sa 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal calf serum*, FCS), 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES-a (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina), 100 IU/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina. Humani dermalni fibroblasti gajeni su u DMEM podlozi (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, *Sigma-Aldrich*), suplementiranoj sa 10 % FCS, 100 IU/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina. Ćelije su održavane na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi koja je sadržala 5 % CO_2. Nakon uspostavljanja rezistentnog fenotipa, A375R ćelije su rutinski održavane u RPMI 1640 podlozi sa 10 % FCS-a i dodatkom 1 µM vemurafeniba.

Primarna kultura dermalnih fibroblasta je uspostavljena iz zdrave kože pacijentkinje operisane na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, metodom tkivnog eksplanta, odnosno *ex vivo* kulture (Zekušic et al., 2017). Uzorak kože prikupljen je tokom hirurške intervencije, odmah prenet u sterilnu epruvetu sa fosfatnim puferom (PBS) i transportovan na ledu do laboratorije. U sterilnim uslovima, uzorak kože je usitnjen skalpelom na tkivne fragmente približne veličine 2 × 2 mm, koji su zatim postavljeni u T25 flask namenjen adherentnim ćelijskim kulturama. Flask je prvo bez dodatka hranljive podloge inkubiran 10 minuta na 37 °C u atmosferi sa 5 % CO_2, kako bi se omogućilo vezivanje tkiva za podlogu, nakon čega je pažljivo dodat DMEM sa 10 % FCS. Nakon nekoliko dana uočena je migracija pojedinačnih fibroblasta iz tkivnih eksplanata. Rast i morfologija ćelija svakodnevno su praćeni pomoću invertnog mikroskopa sa faznim kontrastom. Hranljiva podloga menjana je na svaka 2-3 dana, uz pažljivo rukovanje kako bi se sprečilo odvajanje eksplanata od podloge. Kada su fibroblasti koji su migrirali iz eksplanata dostigli približno 70-80 % konfluentnosti, tkivni fragmenti su uklonjeni sterilnom pincetom, a ćelije odvojene od podloge tretmanom 0,25 % rastvorom tripsin-etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) tokom nekoliko minuta na 37 °C. Odvajanje ćelija praćeno je pomoću invertnog mikroskopa, a delovanje tripsina prekinuto je dodatkom kompletne hranljive podloge čim su se ćelije zaoblile i odvojile od podloge. Ćelijska suspenzija je potom centrifugirana i ćelije su resuspendovane i zasejane u nove posude radi daljeg umnožavanja. Fibroblasti su dalje održavani u DMEM podlozi suplementiranoj sa 10 % FCS-a, 100

IU/mL penicilina i 100 μg/mL streptomicina, na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO_2, uz redovno pasažiranje nakon dostizanja 80-90 % konfluentnosti. Za izvođenje eksperimenata su korišćene ćelije između drugog i četvrtog pasaža.

3.3.2. Određivanje nivoa ekspresije gena NISCH u ćelijskim linijama

Radi određivanja bazalnog nivoa ekspresije *NISCH* informacione RNK (iRNK), ukupna RNK izolovana je iz peleta svih ispitivanih ćelijskih linija primenom reagensa *TRIzol* (*Thermo Fisher Scientific*) u skladu sa uputstvima proizvođača. Ukratko, ćelijski peleti su homogenizovani u *TRIzol* reagensu, nakon čega je dodat hloroform radi razdvajanja uzorka na vodenu i organsku fazu. Nakon snažnog mešanja i inkubacije, razdvajanje faza je izvršeno centrifugiranjem 15 min na 12.000 × g (relativna centrifugalna sila) na 4 °C. Gornja vodena faza koja sadrži RNK je pažljivo preneta u novu epruvetu. RNK je potom precipitirana dodatkom izopropanola. Nakon inkubacije 10 min na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 10 min na 12.000 × g na 4 °C. Dobijeni RNK talog je ispran 75 % etanolom, centrifugiran 5 min na 7.500 × g na 4 °C i kratko osušen. Nakon sušenja, RNK je rastvorena u vodi bez RNaza. Koncentracija i čistoća izolovane RNK su određene spektrofotometrijski pomoću uređaja *BioSpec-nano UV-Vis Spectrophotometer* (*Shimadzu Biotech*). Zatim je RNK reverzno transkribovana u cDNK primenom kompleta *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Thermo Fisher Scientific*), prema uputstvu proizvođača. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qPCR) izvedena je primenom *SYBR Green Master Mix*-a (*Applied Biosystems*) i prajmera specifičnih za gene *NISCH* i *ACTB*. Sekvence korišćenih prajmera navedene su u Tabeli 3.1. Gen *ACTB* korišćen je kao endogena referentna kontrola. Reakcije su izvedene na uređaju *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) primenom sledećeg programa: 2 minuta na 50 °C i 5 minuta na 95 °C, nakon čega je sledilo 40 ciklusa koji su obuhvatali denaturaciju tokom 15 sekundi na 95 °C i vezivanje prajmera i elongaciju tokom 1 minuta na 60 °C. Relativni nivo ekspresije *NISCH* iRNK izračunat je metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$, pri čemu je vrednost Ct za *NISCH* normalizovana u odnosu na vrednost Ct referentnog gena *ACTB*. Ćelijska linija A375 korišćena je kao kalibracioni uzorak i njen relativni nivo ekspresije postavljen je na 1, a ekspresija *NISCH* iRNK u ostalim ćelijskim linijama je izražena relativno u odnosu na A375 ćelije. Eksperiment je izveden najmanje tri puta.

3.3.3. Western blot analiza

Nivoi ekspresije odabranih proteina određeni su metodom *Western blot* (WB), odnosno imunoblot analizom. Za određivanje bazalnih nivoa ekspresije proteina u panelu ispitivanih ćelijskih linija, po 1×10^6 ćelija svake linije je zasejano u Petri šolje prečnika 60 mm i ostavljeno preko noći u inkubatoru na 37 °C (atmosfera sa 5 % CO_2, zasićena vodenom parom). Narednog dana ćelije su isprane rastvorom PBS i lizirane u *Pierce RIPA* (eng. *radioimmunoprecipitation assay*) puferu za lizu ćelija (*Thermo Fisher Scientific*), uz dodatak inhibitora fosfataza i inhibitora proteaza (*Roche*) kako bi se sprečila razgradnja proteina oslobođenim proteazama i defosforilacija fosforilisanih proteina tokom postupka liziranja i pripreme uzoraka. Uzorci su potpuno sakupljeni struganjem skreperom sa adherentne površine Petri šolje, nakon čega su nerastvorljivi ćelijski ostaci uklonjeni centrifugiranjem 15 minuta na 14.000 obrtaja u minuti (eng. *revolutions per minute*, rpm) na 4 °C u centrifugi *Eppendorf 5430R*. Pažljivo odvojeni supernatanti koji su sadržali ukupne ćelijske proteine su čuvani na -80 °C do dalje analize.

Koncentracija proteina određena je primenom testa sa bicinhoninskom kiselinom (eng. *bicinchoninic acid assay*, BCA) (*Thermo Scientific*) prema uputstvu proizvođača, nakon čega su spremljeni uzorci sa jednakim količinama proteina koji su denaturisani u puferu zagrevanjem na 95 °C tokom 5 minuta. Po 20-30 μg proteina iz svakog uzorka razdvojeno je elektroforezom na 10 % poliakrilamidnim gelovima sa natrijum dodecil sulfatom (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS),

pripremljenim primenom kompleta *TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit* (*Bio-Rad*). Nakon elektroforetskog razdvajanja, proteini su elektrotransferom u vlažnim uslovima preneti na polivinilidenfluoridne (PVDF) membrane (*Thermo Fisher Scientific*) koje su prethodno aktivirane u metanolu. Membrane su potom blokirane tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi primenom *EveryBlot Blocking Buffer*-a (*Bio-Rad*), kako bi se saturisala slobodna mesta za vezivanje na membrani i smanjilo nespecifično vezivanje antitela tokom narednih inkubacionih koraka. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane preko noći na 4 °C sa odgovarajućim primarnim antitelima na β-aktin (#3700, *Cell Signaling Technology*; razblaženje 1:2000) i NISCH (#85124, *Cell Signaling Technology*; razblaženje 1:1000). Sutradan je primarno antitelo odliveno, membrane isprane tri puta po 5 minuta Tris-puferom sa dodatkom Tween-a 20 (eng. *Tris-buffered saline with Tween 20*, TBST), a zatim inkubirane tokom 1 sata na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim sa peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP). Korišćena su kozja anti-mišja IgG antitela (#7076, *Cell Signaling Technology*) ili kozja anti-zečja IgG antitela (#7074, *Cell Signaling Technology*), u razblaženju 1:2000. Nakon ispiranja membrana TBST puferom (3 × 5 min), signal je razvijen primenom supstrata *Clarity Western ECL Substrate* (*Bio-Rad*) za pojačanu hemiluminiscenciju (eng. *enhanced chemiluminescence*, ECL) prateći uputstvo proizvođača, pri čemu HRP konjugovan za sekundarno antitelo katalizuje hemiluminiscentnu reakciju sa supstratom, što omogućava detekciju ciljnih proteina. Membrane su snimane na sistemu *Azure600 Blot Imaging System* (*Azure Biosystems*).

Denzitometrijska kvantifikacija proteinskih traka na snimcima dobijenim *Western blot* metodom izvršena je pomoću programa *ImageJ* (*National Institutes of Health, SAD*). Za svaku proteinsku traku definisana je pravougaona oblast od interesa (eng. *region of interest*, ROI) jednake površine pomoću alata *Rectangle*, nakon čega je izmerena integrisana gustina (eng. *Integrated Density*, IntDen). Intenzitet pozadine određen je u neposrednoj blizini odgovarajuće trake, korišćenjem ROI iste površine. Budući da su analizirane tamne trake na svetloj pozadini, korigovani intenzitet signala izračunat je oduzimanjem integrisane gustine proteinske trake od integrisane gustine pozadine. Za proteine čiji je nivo određivan pojedinačno, korigovani intenzitet signala normalizovan je u odnosu na korigovani intenzitet odgovarajuće β-aktinske trake, koja je korišćena kao kontrola nanošenja. Rezultati su izraženi kao relativni intenzitet proteinskog signala, odnosno relativni odnos proteina, i grafički prikazani pomoću programa *GraphPad Prism*.

3.3.4. Imunocitohemijska lokalizacija nišarina

A375 ćelije su zasejane na sterilna pokrovna stakalca postavljena u bunare ploče sa 6 bunara (*Thermo Fisher Scientific*), u gustini od 5×10^4 ćelija po bunaru. Nakon inkubacije tokom noći, ćelije su fiksirane 3,7 % rastvorom formaldehida tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su permeabilizovane 0,2 % rastvorom *Triton X-100* (*Sigma-Aldrich*) tokom 2 minuta na ledu, a zatim ponovo isprane PBS-om. Nespecifična mesta vezivanja blokirana su inkubacijom sa 1,5 % rastvorom goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) u PBS-u tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Fiksirane ćelije su potom inkubirane preko noći na 4 °C sa zečjim poliklonskim anti-NISCH primarnim antitelom (#HPA023189, *Sigma-Aldrich*) razblaženje 1:20. Sutradan, nakon ispiranja PBS-om, ćelije su inkubirane tokom 1 sata na sobnoj temperaturi sa kozjim anti-zečjim IgG sekundarnim antitelom konjugovanim sa fluoroforom *Cyanine3* (#A10520, *Thermo Fisher Scientific*), razblaženim 1:500. Istovremeno je dodat *DyLight* 488-faloidin (#12935, *Cell Signaling Technology*), u razblaženju 1:50, radi vizualizacije filamentnog aktina. Inkubacija sa fluorescentnim reagensima sprovedena je zaštićeno od svetlosti. Nakon ispiranja PBS-om, nukleusi su obojena 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI; #90229, *Merck Millipore*) razblaženim 1:1000 u PBS-u, tokom 1 minuta. Nakon finalnog ispiranja, pokrovna stakalca su montirana na predmetna stakla korišćenjem Mowiol medijuma za montiranje i čuvana na +4 °C u mraku do mikroskopske analize. Ćelije su analizirane pomoću fluorescentnog mikroskopa *Zeiss PALM MicroBeam Axio Observer Z1*,

korišćenjem 63× *Zeiss LD Plan-Neofluar* objektiva, pri čemu je snimljeno deset nasumično odabranih polja. Signal nišarina detektovan je u crvenom, F-aktina u zelenom, a nukleusa u plavom fluorescentnom kanalu.

3.3.5. MTT test vijabilnosti

Uticaj ispitivanih agonista nišarina na preživljavanje i rast ćelija u kulturi je određen kolorimetrijskim MTT testom (Supino, 1995). MTT test meri metaboličku aktivnost ćelija i koristi se kao indirektna mera vijabilnosti, a zasniva se na činjenici da žive, metabolički aktivne ćelije redukuju tetrazolijumsku so 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) žute boje do nerastvorljivih kristala formazana plave boje. Međutim, važno je naglasiti da rezultati MTT testa nisu direktna mera broja živih ćelija, već pad signala pored citotoksičnosti može značiti i smanjenu proliferaciju ili citostazu (zaustavljanje ćelijskog ciklusa), kao i smanjen mitohondrijalni metabolizam i ukupni redukcioni/metabolički kapacitet ćelije.

U ploče sa 96 bunarića, zasejano je po 2.000 (A375, A375R), 3.000 (518a2) ili 4.000 ćelija (HTB-140, FemX-I, HaCaT, dermalni fibroblasti) po bunariću, zavisno od karakteristika ćelijske linije. Ćelije su sađene u triplikatu, odnosno u tri bunarića mikrotitarske ploče, dok je u dodatna tri bunarića ploče sipano samo po 100 μL hranljive podloge (slepa proba). Ćelije su ostavljene 24 h u inkubatoru na 37 °C (atmosfera sa 5 % CO_2, zasićena vodenom parom), da se adekvatno zalepe za dno bunarića.

Rilmenidin hemifumarat (R-134), moksonidin hidrohlorid (M1559) i klonidin hidrohlorid (C7897) su kupljeni od proizvođača *Sigma-Aldrich* i rastvoreni u dimetil-sulfoksidu (DMSO) prema uputstvu proizvođača. Nakon 24 h od zasejavanja ćelija, u triplikate bunarića sa ćelijama i slepom probom sipana su serijska razblaženja tretmana tako da maksimalna finalna koncentracija jedinjenja po bunariću ploče bude 100 μM. Procenat DMSO po bunariću nije prelazio 0,5 %. Nakon 72 h inkubacije, u svaki bunarić mikrotitarske ploče je dodato po 20 μL MTT rastvora (5 mg/mL u PBS, *Sigma-Aldrich*) i mikrotitarske ploče su inkubirane 4 h u mraku na 37 °C. Nakon inkubacije, dodato je po 100 μL 10 % rastvora SDS-a (*Sigma-Aldrich*) u svaki bunarić, kako bi se rastvorili formirani kristali formazana. Apsorbancije su merene nakon 24 h na talasnoj dužini od 570 nm pomoću *Multiskan EX* čitača mikrotitarskih ploča (*Thermo Scientific*). Vrednosti polumaksimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}; μM) su određene iz krivih doza-odgovor kao koncentracije jedinjenja koje dovode do 50 % smanjenja redukcije MTT u odnosu na kontrolne ćelije koje su bez tretmana, a rezultati su analizirani i grafički prikazani korišćenjem programa *GraphPad Prism*. Vrednosti MTT redukcije su prvo normalizovane tako da je odgovor netretirane kontrole definisan kao 100 % vijabilnost, dok je vrednost potpune inhibicije postavljena na 0 %, čime se omogućava direktno poređenje inhibitorne efikasnosti agonista između različitih ćelijskih linija. Podaci o koncentracijama su zatim logaritamski transformisani primenom funkcije x = log(x), nakon čega je izvršeno fitovanje primenom nelinearne regresije i modela *log(inhibitor) vs. normalized response*. IC_{50} vrednosti su prikazane kao najbolje procenjene vrednosti dobijene nelinearnom regresijom, zajedno sa 95 % intervalima ppoverenja (CI). Urađena su najmanje tri nezavisna eksperimenta u tehničkom triplikatu za svaki ispitivani agens na određenoj ćelijskoj liniji.

3.3.6. Ispitivanje aktivnosti rilmenidina na modelu tumorskih sferoida

Tumorski sferoidi predstavljaju ćelijske agregate koji se koriste kao *in vitro* trodimenzionalni (eng. *three-dimensional*, 3D) modeli solidnih tumora, jer bolje reprodukuju arhitekturu i mikrookruženje tumorskog tkiva u poređenju sa klasičnim dvodimenzionalnim (2D) kulturama. Ćelije koje rastu u 3D uslovima pokazuju izražene razlike u morfologiji, proliferativnom kapacitetu i metaboličkom profilu u odnosu na ćelije gajene u monosloju. Za razliku od 2D kultura, gde su ćelije relativno uniformno izložene kiseoniku i nutrijentima, 3D sferoidi formiraju gradijente kiseonika, hranljivih materija i signalnih molekula, što dovodi do pojave heterogenih zona koje bolje imitiraju

tumorsku *in vivo* organizaciju, uključujući proliferativnu periferiju i hipoksično jezgro koje često postaje nekrotično.

Po 1.000 ćelija linija A375 i 518a2 je zasejano po bunariću u slabo adherentnim mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića sa U (okruglim) dnom, koje podstiče međućelijsku adheziju i formiranje sferoida. Nakon 96 h inkubacije ćelija u inkubatoru na 37 °C (atmosfera sa 5 % CO_2, zasićena vodenom parom), ćelije spontano agregiraju na dnu slabo adherentnih bunarića pod uticajem gravitacije i u svakom bunariću formiran je jedan tumorski sferoid A375 ćelija prečnika oko 500-600 μm, dok su 518a2 ćelije formirale nešto sitnije sferoide prečnika oko 400 μm. Formiranje i rast sferoida su posmatrani pod invertnim svetlosnim mikroskopom (*Olympus CX33*).

Kako bi se ispitao uticaj rilmenidina na preživljavanje ćelija u sferoidima, korišćen je MTT test. U medijum iz bunarića sa sferoidima je dodat serijski razblažen tretman do najviše koncentracije od 400 μM. Sferoidi su potom inkubirani naredna 72 h u inkubatoru na 37 °C (atmosfera sa 5 % CO_2, zasićena vodenom parom). Nakon završetka tretmana, svaki sferoid je mehaničkim pokretima pipete razbijen na pojedinačne ćelije, i potom je ceo sadržaj U bunara prebačen u bunar mikrotitarske ploče sa 96 bunarića sa ravnim dnom, nakon čega su efekti tretmana analizirani MTT testom kao što je prethodno opisano.

Snimci sferoida dobijeni mikroskopijom u svetlom polju (eng. *bright-field*) su analizirani u programu *ImageJ* (*National Institutes of Health, USA*). Kontura svakog sferoida definisana je kao region od interesa, nakon čega su određeni projektovana površina sferoida (eng. *Area*) i parametri oblika *Circularity* (pokazatelj sličnosti objekta idealnom krugu, osetljiv na nepravilnosti spoljašnje konture) i *Solidity* (pokazatelj morfološke kompaktnosti sferoida). Za svaki nezavisni eksperiment izračunate su prosečne vrednosti dobijene analizom tri tehnička ponovka, tako da je za svaki tretman i vremensku tačku dalje korišćena po jedna vrednost po eksperimentu. S obzirom na to da su izvedena tri nezavisna eksperimenta, u statističku analizu uključene su tri nezavisne vrednosti po grupi ($n = 3$), a tehnički ponovci nisu tretirani kao nezavisna merenja. Radi praćenja promena pojedinačnih morfoloških parametara tokom vremena, vrednosti dobijene nakon 24, 48 i 72 h tretmana normalizovane su na odgovarajuću vrednost u nultom satu istog eksperimenta, kojem je dodeljena vrednost 1. Na ovaj način relativne vrednosti za *Area*, *Circularity* i *Solidity* izražene su u odnosu na odgovarajuću početnu vrednost u 0 h. Statistička analiza izvršena je u programu *GraphPad Prism*.

3.3.7. Ispitivanje efekata rilmenidina na formiranje tumorskih sferoida

Pored efekata na već formirane sferoide, ispitivan je i uticaj rilmenidina na samo formiranje tumorskih sferoida. A375 i 518a2 ćelije su zasađene u gustini od 2.000 ćelija po bunariću slabo adherentnih mikrotitarskih ploča sa 96 U bunara u 200 μL kompletnog RPMI medijuma sa serijskim razblaženjima rilmenidina do maksimalne koncentracije od 400 μM. Ćelije su potom inkubirane naredna 72 h u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen vodenom parom, sa 5 % CO_2) i formiranje i rast sferoida su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (*Olympus CX33* invertni mikroskop). Efekti sedamdesetdvočasovnog tretmana na vijabilnost ćelija su ispitani MTT testom kao što je prethodno opisano.

Formiranje ćelijskih agregata praćeno je mikroskopski nakon 24, 48 i 72 h. Eksperiment je izveden dva puta nezavisno, sa po četiri tehnička ponovka za svaku koncentraciju rilmenidina. Uticaj rilmenidina na rast i kompaktnost sferoida, kao i na vijabilnost pojedinačnih ćelija, analiziran je nakon 72 h i fluorescentnom mikroskopijom, nakon bojenja sferoida kalcein-acetoksimetilestrom (kalcein-AM, *Sigma-Aldrich*) i propidijum-jodidom (eng. *Propidium Iodide*, PI). Metoda se zasniva na konverziji nefluorescentne boje kalcein-AM u zeleno fluorescirajući produkt kalcein pod uticajem intracelularnih esteraza u živim ćelijama, što omogućava procenu vijabilnosti ćelija. Nakon završenog 72 h kotretmana sa različitim koncentracijama rilmenidina, sferoidi su bojeni smešom kalcein-AM (finalna koncentracija 3 μM) i PI (5 μM) pripremljenom u PBS. Inkubacija je trajala 30 minuta na 37 °C u mraku. Sferoidi su potom posmatrani i slikani fluorescentnim mikroskopom *Zeiss PALM MicroBeam Axio Observer Z1*, koristeći 5× i 10× *Zeiss LD Plan-Neofluar* objektiv. Snimljene

fluorescentne slike analizirane su pomoću programa *ImageJ* (National Institutes of Health, USA). Za svaki sferoid ručno je definisana odgovarajuća oblast od interesa (eng. *region of interest*, ROI), koja je obuhvatala celu strukturu sferoida, odnosno ćelijskog agregata. U okviru istog ROI zasebno su analizirani zeleni kanal, koji odgovara fluorescenciji kalceina, i crveni kanal, koji odgovara PI fluorescenciji. Za oba kanala određivana je integrisana gustina fluorescentnog signala (eng. *Integrated Density*, IntDen). Relativni udeo PI signala izračunat je prema formuli:

$$\text{PI IntDen} / (\text{PI IntDen} + \text{kalcein IntDen}) \times 100$$

i izražen kao procenat ukupnog fluorescentnog signala u analiziranom ROI. Pored intenziteta fluorescencije, u programu *ImageJ* određivana je i površina (*Area*) sferoida, odnosno ćelijskog agregata ili skupa rasutih ćelija. Dobijene vrednosti površine normalizovane su u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, kojoj je dodeljena vrednost 1. Dobijeni podaci dalje su analizirani u programu *GraphPad Prism*.

3.3.8. Mikroskopska analiza vijabilnosti ćelija tretiranih rilmenidinom

Kako rezultati MTT testa nisu direktna mera broja živih ćelija, efekti rilmenidina na vijabilnost A375 ćelija analizirani su i mikroskopski, primenom komercijalnog kompleta *ReadyProbes Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green* (*Thermo Fisher Scientific*) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, A375 ćelije su zasejane u ploče sa 6 bunara u gustini od 2×10^5 ćelija po bunaru i ostavljene preko noći u inkubatoru na 37 °C (atmosfera sa 5 % CO_2, zasićena vodenom parom). Sutradan, ćelije su tretirane 50 μM rilmenidinom tokom 48 h, uporedo sa odgovarajućom kontrolnom grupom bez tretmana. Po isteku 48 h, direktno u medijum su dodati reagensi *NucBlue Live* (ukupna populacija ćelija) i *NucGreen Dead* (mrtve ćelije) u dozi od po 2 kapi na 1 mL medijuma, nakon čega je usledila inkubacija od 15-30 minuta na 37 °C. Ćelije su kvantifikovane pod fluorescentnim mikroskopom *ZOE Fluorescent Cell Imager* (*Bio-Rad Laboratories, Inc.*) sa monohromatskom kamerom (12-bitni CMOS senzor, 5 megapiksela), a morfološke promene ćelija su analizirane pri standardnoj iluminaciji svetlog polja. Eksperiment je izveden u dva nezavisna biološka ponavljanja, pri čemu su u svakom ponavljanju za svaku eksperimentalnu grupu analizirana po četiri nasumično odabrana vidna polja. Broj ukupnih i mrtvih ćelija određivan je ručno u programu *ImageJ*, označavanjem i pojedinačnim brojanjem ćelija u odgovarajućim fluorescentnim kanalima. Broj *NucBlue*-pozitivnih nukleusa korišćen je kao mera ukupnog broja ćelija, dok je broj *NucGreen*-pozitivnih nukleusa predstavljao broj mrtvih ćelija. Udeo mrtvih ćelija izračunat je kao odnos broja *NucGreen*-pozitivnih i ukupnog broja *NucBlue*-pozitivnih ćelija, pomnožen sa 100.

3.3.9. Kvantifikacija apoptoze protočnom citometrijom

Udeo ćelija koje nakon tretmana ulaze u proces programirane ćelijske smrti, apoptozu, kvantifikovan je primenom komercijalnog *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit* (*BD Biosciences*) na protočnom citometru *FACSCalibur* (*BD Biosciences*). Metoda se zasniva na dvostrukom bojenju ćelija aneksinom V konjugovanim sa fluorescein-izotiocijanatom (FITC) i propidijum-jodidom, čime se omogućava diferencijacija živih ćelija od ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze, kao i ćelija sa narušenim integritetom membrane koje se u ovom eseju klasifikuju kao nekrotične. Aneksin V sa visokim afinitetom vezuje eksternalizovani fosfatidilserin koji je rani marker apoptoze, dok PI prodire samo u ćelije sa narušenim integritetom plazma membrane. Na osnovu kombinacije ovih signala razlikuju se četiri populacije ćelija: vijabilne (Annexin V^-/PI^-), rano apoptotske (Annexin V^+/PI^-), kasno apoptotske/sekundarno nekrotične (Annexin V^+/PI^+), i ćelije sa narušenim integritetom membrane tj. primarno nekrotične ćelije (Annexin V^-/PI^+).

Za potrebe eksperimenta, A375 i 518a2 ćelije zasejane su u ploče sa 6 bunara u gustini od 2×10^5 ćelija po bunaru i ostavljene su preko noći kako bi se zalepile za dno bunara. Sutradan je u bunare kontrolne grupe dodat svež medijum, dok su u ostale bunare dodati sveže pripremljeni rastvori rilmenidina u odgovarajućim koncentracijama. Nakon 24 h i 48 h inkubacije, plivajuće ćelije su sakupljene, a adherentne su isprane hladnim PBS-om, odvojene tripsinizacijom, nakon čega su obe frakcije objedinjene i centrifugirane. Ćelijski talog je potom ispran PBS-om i resuspendovan u puferu za vezivanje aneksina (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$). Ćelijska suspenzija, koja je sadržala oko 1×10^5 ćelija, inkubirana je sa aneksinom V-FITC i PI u mraku tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, prema uputstvu proizvođača. Uzorci su analizirani korišćenjem *FACSCalibur* protočnog citometra (*BD Biosciences*) i *CellQuest Pro* softvera (*Becton Dickinson*) u roku od 1 h od završetka bojenja.

3.3.10. Analiza ćelijskog ciklusa primenom protočne citometrije

Uticaj rilmenidina na distribuciju A375 i 518a2 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa analiziran je protočnom citometrijom (*FACSCalibur*, *BD Biosciences*) nakon bojenja propidijum-jodidom. Metoda se zasniva na kvantifikaciji sadržaja DNK po ćeliji, koji varira u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa. PI je fluorescentna boja koja se interkalira u dvolančanu DNK i emituje fluorescenciju proporcionalnu sadržaju DNK, čime omogućava razdvajanje populacija ćelija u G_0/G_1, S i G_2/M faze ćelijskog ciklusa.

Za potrebe ove analize, A375 i 518a2 ćelije zasejane su u ploče sa 6 bunara u gustini od 2×10^5 ćelija po bunaru. Nakon 24 h inkubacije, medijum je odbačen. U bunare kontrolne grupe dodat je svež medijum, dok su u ostale bunare dodati sveže pripremljeni rastvori rilmenidina odgovarajućih koncentracija. Nakon 24 h i 48 h tretmana, ćelije su odvojene tripsinizacijom, isprane PBS-om i fiksirane postepenim dodavanjem kap po kap hladnog 70 % etanola uz vorteksovanje. Uzorci su čuvani na -20 °C do analize. Pre same analize, fiksirane ćelije su isprane hladnim PBS-om uz centrifugiranje radi potpunog uklanjanja etanola. S obzirom na to da PI može da se vezuje i za RNK, uzorci su tretirani RNazom A (eng. *ribonuclease A*, RNaseA; *Sigma-Aldrich*; 1 mg/mL) tokom 30 min na 37 °C radi uklanjanja RNK i obezbeđivanja specifičnog bojenja DNK. Neposredno pre analize, uzorcima je dodato 50 µL propidijum-jodida (*Sigma-Aldrich*, 400 µg/mL). Pripremljeni ćelijski uzorci su analizirani na *FACSCalibur* protočnom citometru u roku od 30 minuta, a obrada podataka izvršena je pomoću *CellQuest Pro* softvera (*BD Biosciences*). Na osnovu histograma sadržaja DNK određen je procenat ćelija u sub-G_1 populaciji (hipodiploidne/apoptotske ćelije), kao i raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

3.3.11. Uticaj tretmana na adheziju ćelija

Ispitivanje adhezivnog kapaciteta ćelija omogućava procenu uticaja tretmana na interakciju tumorskih ćelija sa podlogom i stabilnost njihovog citoskeleta. Kako bi se utvrdilo da li rilmenidin sprečava primarno prilepljivanje ćelija za podlogu ili indukuje odvajanje već zalepljenih ćelija, sprovedena je procena dinamičkih promena u ćelijskoj adheziji pod dejstvom tretmana tokom vremena.

Ćelije linija A375 i 518a2 su zasejane u ploče sa 24 bunara (*Corning*) u gustini od 5×10^3 ćelija po bunaru. Za procenu uticaja tretmana na odvajanje već prilepljenih ćelija, nakon inkubacije preko noći i adhezije ćelija za dno bunara, u hranljivi medijum dodat je 100 µM rilmenidin. Efekti na odlepljivanje ćelija snimani su u vremenskim tačkama 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon dodavanja tretmana. Za procenu uticaja tretmana na formiranje adhezije, ćelije obe linije zasejane su direktno u medijum koji sadrži 100 µM rilmenidin, nakon čega je njihovo prilepljivanje za podlogu praćeno u istim vremenskim tačkama, 0, 2, 4, 6 i 24 h nakon sejanja. Morfologija i adhezivni status ćelija uočavani su pomoću invertnog mikroskopa *Olympus CX33*, opremljenog *Olympus EP50* digitalnom kamerom.

Ćelije okruglog oblika sa izraženim svetlim obodom zbog prelamanja svetlosti pri fazno-kontrastnoj mikroskopiji, klasifikovane su kao nezalepljene, dok su ćelije sa formiranim ćelijskim produžecima, filopodijama ili lamelipodijama ili raširenim oblikom klasifikovane kao zalepljene. Procenat adheriranih ćelija određen je u svakoj vremenskoj tački analizom mikroskopskih snimaka.

Nakon slikanja tačke 24 h, sve ćelije iz bunara su skupljene radi određivanja broja živih i mrtvih ćelija testom sa tripan-plavim, koji omogućava određivanje brojnosti vijabilnih ćelija procenom integriteta ćelijske membrane. Ovaj test se zasniva se na činjenici da žive, vijabilne ćelije poseduju intaktnu ćelijsku membranu koja sprečava ulazak boje tripan-plavog, te citoplazma ostaje neobojena, dok u ćelije sa narušenom membranom boja slobodno ulazi i boji ih plavo. Pripremljena ćelijska suspenzija pomešana je sa rastvorom tripan-plavog, prenesena na *Neubauer* hemocitometarsku pločicu i ćelije su izbrojane pod svetlosnim mikroskopom (*Carl Zeiss*) pri uveličanju objektiva od 6,3×.

3.3.12. Test zarastanja rane

Test zarastanja rane (eng. *wound-healing assay*, *scratch assay*) predstavlja *in vitro* metodu za procenu usmerenog migracionog kapaciteta ćelija. Metoda se zasniva na mehaničkom stvaranju "rane", tj. praznog prostora bez ćelija u konfluentnom monosloju ćelija, nakon čega se prati zatvaranje tog prostora tokom vremena. Brzina zatvaranja rane odražava migracionu sposobnost ćelija i ukazuje na uticaj tretmana na procese važne za ćelijsku migraciju i invazivnost.

Ćelije linija A375 i 518a2 zasejane su u ploče sa 6 bunara u gustini od 5×10^5 ćelija po bunaru, u hranljivom medijumu suplementovanom sa 10 % FCS. Dvadeset četiri sata nakon sejanja, u konfluentnom monosloju ćelija napravljena je tzv. rana povlačenjem sterilnog vrha pipete zapremine 200 μL, nakon čega su odvojene ćelije uklonjene ispiranjem PBS rastvorom. Kako bi se smanjila proliferacija ćelija tokom eksperimenta i obezbedilo da zatvaranje rane bude primarno posledica usmerene ćelijske migracije, a ne njihovog umnožavanja, eksperiment je sproveden u medijumu sa redukovanim sadržajem seruma na 1 %. Slike najmanje dve reprezentativne oblasti po bunaru snimljene su u vremenskim tačkama 0, 12, 24 i 48 h nakon primene tretmana, pri uvećanju od 10× na invertnom mikroskopu *Olympus CX33*, opremljenom *Olympus EP50* digitalnom kamerom. Površina rane u svakoj vremenskoj tački kvantifikovana je korišćenjem softvera *ImageJ* (verzija 1.53e, *National Institutes of Health*). Procenat zatvaranja rane izračunat je u naznačenim vremenskim tačkama nakon njenog formiranja i normalizovan u odnosu na odgovarajuću netretiranu kontrolu.

3.3.13. Transwell testovi migracije i invazije

Transwell esej predstavlja *in vitro* metodu za procenu migracionog i invazivnog potencijala ćelija na osnovu njihove sposobnosti da prolaze kroz poroznu membranu prema hemotaktičkom stimulusu. Ćelije se seju u gornju komoru insert sistema, dok se u donjoj komori nalazi medijum sa serumom koji deluje kao hemoatraktant i stvaranjem koncentracionog gradijenta stimuliše usmerenu migraciju ćelija ka području više koncentracije. U slučaju testa invazivnosti, gornja površina membrane se prethodno oblaže odgovarajućom komponentom ekstracelularnog matriksa, čime se formira dodatna barijera kroz koju ćelije moraju da prođu. Sam izbor matriksa omogućava modelovanje različitih aspekata tumorske invazije. Tako ekstrakt bazalne membrane (eng. *basement membrane extract*, BME), bogat lamininom i kolagenom IV, predstavlja model barijere slične bazalnoj membrani koju melanomske ćelije moraju da savladaju tokom prelaska iz radijalne u vertikalnu fazu rasta. S druge strane, kolagen tipa I je dominantna komponenta dermalnog intersticijskog matriksa kroz koji melanomske ćelije prolaze nakon narušavanja bazalne membrane. Primena različitih matriksnih barijera stoga omogućava procenu zavisnosti invazivnog ponašanja ćelija od sastava ekstracelularnog matriksa.

Za određivanje migracije ćelija primenom *transwell* testa, 5×10^4 A375 ćelija zasejano je u inserte sa porama prečnika 8,0 μm (*Corning Scientific*) u medijumu bez seruma, sa ili bez prisustva 25 μM rilmenidina. Medijum u donjoj komori je bio suplementovan sa 10 % FCS, koji je služio kao hemoatraktant. Ćelije su inkubirane tokom 16 h u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen vodenom parom, sa 5 % CO_2). Za procenu invazivnog potencijala, porozne membrane inserta prethodno su obložene kolagenom tipa I (2 μg/cm^2; *Sigma-Aldrich*) ili preparatom *Cultrex Basement Membrane Extract* (približno 0,3 mg/mL; *R&D Systems*). Nakon nanošenja komponenti matriksa, inserti su inkubirani 2 h na 37 °C u atmosferi sa 5 % CO_2 zasićenoj vodenom parom, kako bi se omogućilo formiranje stabilnog matriksnog sloja. Zatim su ćelije zasejane i ostavljene da invadiraju tokom 16 h pod identičnim eksperimentalnim uslovima kao kod testa migracije. Ćelije koje su migrirale ili invadirale kroz pore na donju stranu membrane fiksirane su u 3,7 % rastvoru formaldehida tokom 15 minuta i obojene 0,5 % rastvorom boje kristal-violeta (eng. *crystal violet*) u 25 % metanolu. Slike fiksiranih i obojenih ćelija snimljene su pri objektivskom uvećanju od 10× na invertnom mikroskopu *Olympus CX33* sa *Olympus EP50* digitalnom kamerom u najmanje tri nasumično odabrana, reprezentativna vidna polja po insertu.

Kako bi se utvrdilo da li uočene promene invazivnog potencijala potiču od promena bazične migratorne sposobnosti ćelija ili od specifičnih promena njihove sposobnosti prolaska kroz ekstracelularni matriks, izračunat je relativni indeks invazivnosti u odnosu na kontrolu prema formuli:

$$\text{Indeks invazivnosti} = \frac{I_T \times M_K}{M_T \times I_K}$$

gde su: I_T – broj invadiranih tretiranih ćelija kroz kolagen ili BME, M_K – broj migriranih kontrolnih ćelija, M_T – broj migriranih tretiranih ćelija, I_K – broj kontrolnih ćelija koje su invadirale kroz matriks.

3.3.14. Sekvenciranje RNK

Sekvenciranje RNK (eng. *RNA sequencing*, RNA-seq) predstavlja metodu za sveobuhvatnu analizu transkriptoma, koja omogućava identifikaciju i kvantifikaciju RNK transkripata prisutnih u biološkom uzorku (Z. Wang et al., 2009). Metoda se zasniva na pripremi biblioteka iz izolovane RNK, njihovom sekvenciranju tehnologijama visokopropusnog sekvenciranja, nakon čega se očitane sekvence obrađuju i poravnavaju sa referentnim genomom što omogućava identifikaciju transkripata i kvantifikaciju ekspresije gena (Conesa et al., 2016). Poređenjem transkriptomskih profila različitih eksperimentalnih grupa je zatim moguće identifikovati diferencijalno eksprimirane gene i ispitati molekularne promene povezane sa određenim tretmanom (Conesa et al., 2016).

A375 ćelije su zasejane u Petri šolje prečnika 60 mm u gustini od 3×10^5 ćelija po šolji, i inkubirane preko noći kako bi se omogućilo njihovo vezivanje za podlogu. Narednog dana podloga je zamenjena svežom podlogom sa 25 μM rilmenidina ili odgovarajućom kontrolnom podlogom bez rilmenidina. Nakon 24 h i 48 h tretmana sakupljene su i plivajuće i adherentne ćelije, frakcije su objedinjene, isprane PBS-om i centrifugirane radi dobijanja ćelijskog peleta. Dobijeni peleti čuvani su na −80 °C do izolacije RNK. Ukupna RNK izolovana je korišćenjem TRIzol reagensa (*Life Technologies*), a njena koncentracija određena je pomoću BioSpec-nano spektrofotometra (*Shimadzu Biotech*). Uzorci su pripremljeni u vodi bez RNaza, u konačnoj koncentraciji od 20 ng/μL, i poslati kompaniji *Novogene* (Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo) na suvom ledu.

Kontrolu kvaliteta RNK, pripremu biblioteka, sekvenciranje i bioinformatičku analizu sprovela je kompanija *Novogene*. Informaciona RNK izdvojena je pomoću magnetnih kuglica sa poli-T oligonukleotidima, nakon čega su pripremljene biblioteke za transkriptomsko sekvenciranje. Biblioteke su sekvencirane na platformi *Illumina NovaSeq*, pri čemu su generisana uparena očitavanja dužine 150 bp. Nakon uklanjanja adapterskih sekvenci i očitavanja niskog kvaliteta, prečišćena

očitavanja poravnata su sa referentnim genomom korišćenjem programa *HISAT2*, verzija 2.0.5. Broj očitavanja mapiranih na pojedinačne gene određen je programom *featureCounts*, verzija 1.5.0-p3.

3.3.15. Analiza obogaćenosti genskih skupova nakon tretmana rilmenidinom

Za ispitivanje promena koje rilmenidin izaziva u različitim signalnim putevima ćelija melanoma korišćeni su podaci RNK sekvenciranja A375 ćelija tretiranih sa 25 μM rilmenidinom tokom 24 i 48 h, kao i odgovarajućih netretiranih kontrola. Analize su sprovedene odvojeno za 24 i 48 h. S obzirom na nedostupnost bioloških ponovaka, primenjen je pristup prethodnog rangiranja gena *GSEA Preranked*.

Kao polazni podaci korišćeni su sirovi brojevi očitavanja (eng. *raw counts*) dobijeni od kompanije *Novogene* koja je uslužno obavila RNK sekvenciranje. Podaci o broju očitavanja po genu za kontrolne i rilmenidinom tretirane A375 ćelije nakon 24 i 48 h deponovani su u repozitorijumu *Zenodo* (https://zenodo.org/) i javno su dostupni pod digitalnim identifikatorom objekta (eng. *digital object identifier*, DOI) 10.5281/zenodo.23037230. Vrednosti su normalizovane metodom medijane odnosa (eng. *median-of-ratios*), pri čemu je za svaki uzorak određen faktor normalizacije na osnovu odnosa ekspresije pojedinačnih gena prema pseudoreferentnom uzorku formiranom iz njihovih geometrijskih sredina (Anders & Huber, 2010). Za dalje rangiranje zadržani su anotirani protein-kodirajući geni sa validnim i jedinstvenim genskim simbolima. Radi smanjenja uticaja veoma niskog broja očitavanja na procenu promene ekspresije, za svaku vremensku tačku isključeni su geni čija je srednja normalizovana vrednost broja očitavanja u kontrolnom i tretiranom uzorku bila manja od 10. Za svaki gen je zasebno za 24 i 48 h izračunata promena ekspresije prema formuli:

$$\log_2 [(\text{normalizovani count}_{\text{tretman}} + 1) / (\text{normalizovani count}_{\text{kontrola}} + 1)]$$

Pozitivne vrednosti označavale su povećanje, a negativne smanjenje ekspresije nakon tretmana rilmenidinom. Geni su rangirani od najveće pozitivne do najveće negativne vrednosti $\log_2$FC.

Analiza obogaćenosti genskih skupova sprovedena je pomoću programa GSEA, verzija 4.1.0**,** primenom modula *GSEAPreranked*. GSEA omogućava procenu da li se unapred definisani skupovi funkcionalno povezanih gena preferencijalno nalaze na vrhu ili dnu rangirane liste, čime se promene analiziraju na nivou koordinisanih bioloških programa, a ne samo pojedinačnih gena (Subramanian et al., 2005). Za analizu su korišćeni humani genski skupovi iz MSigDB baze (verzija 2026.1.Hs), i to *Hallmark* i *Reactome* kolekcije. U *GSEAPreranked* analizi primenjeno je 1.000 permutacija na nivou genskih skupova bez dodatnog kolapsiranja identifikatora gena. Minimalna veličina analiziranog genskog skupa iznosila je 15, a maksimalna 500 gena. Za izračunavanje skora obogaćenosti korišćena je *classic* statistika obogaćenosti. Za svaki genski skup određen je normalizovani skor obogaćenosti (NES), pri čemu pozitivan NES označava obogaćenost genskog skupa nakon tretmana, dok negativna vrednost ukazuje na obogaćenost među genima čija je ekspresija smanjena sa tretmanom. S obzirom na odsustvo bioloških replikata, analiza je interpretirana kao eksplorativna analiza funkcionalnih genskih programa i kao statistički relevantni izdvojeni su genski skupovi sa nominalnim $P < 0,05$ i strožom granicom za stopu lažnih otkrića, FDR $q < 0,05$**.**

3.4. Statistička analiza

Prilikom opisa starosti pacijenata, korišćene su mere deskriptivne statistike: medijana i opseg (raspon). Zbog malog broja slučajeva u podgrupama formiranim prema kliničkim i histopatološkim karakteristikama melanoma, inferencijalna statistička analiza nije sprovođena za te varijable. Rezultati su prikazani deskriptivno, kao broj (n) i procentualna zastupljenost u skupu podataka (%).

Podaci o ekspresiji *NISCH* gena iz setova GSE3189, GSE46517 i TCGA SKCM su najpre transformisani primenom logaritamske transformacije $\log_2(Y)$, kako bi se stabilizovala varijanca i distribucija približila normalnoj (eng. *variance stabilizing transformation*). U setu TCGA SKCM, Y je predstavljalo normalizovane RSEM (*RNA-Seq by Expectation-Maximization*) vrednosti ekspresije, dok su u GEO setovima GSE3189 i GSE46517 u pitanju bili MAS5-normalozovani (eng. *Microarray Suite 5.0*) i *RMA*-normalozovani (eng. *robust multi-array average*) signalni intenziteti sa platforme *Affymetrix Human Genome U133A Array*.

Normalnost distribucije podataka proverena je za ukupne setove uzoraka, kao i za podgrupe formirane pri analizi kliničko-histopatoloških karakteristika, primenom sledećih testova: Anderson-Darlingov, D'Agostino-Pirsonov, Šapiro-Vilkov i Kolmogorov-Smirnovljev. Vizuelna provera distribucije obuhvatila je histogram (frekvencijsku distribuciju sa automatski određenim intervalima) i kvantil–kvantil grafikon (eng. *quantile-quantile plot*, QQ plot), koji su potvrdili približnu normalnost posle transformacije, uz identifikaciju potencijalnih odstupajućih vrednosti (eng. *outliers*). Odstupajuća vrednost u skupu podataka TCGA SKCM je identifikovana koristeći *ROUT* (eng. *robust regression and outlier removal*) metodu (Q = 1 %), ali je zadržana u analizi jer nije bilo podataka da je predstavljala tehnički, a ne biološki artefakt, uz ponovljenu proveru uticaja na rezultate pri čemu nije utvrđen statistički značajan uticaj.

Za poređenje između dve grupe podataka, primenjen je neupareni Studentov *t*-test kada su podaci bili normalno distribuirani i varijanse jednake, u suprotnom, korišćen je neparametarski Man-Vitnijev test. Za korelacije između kontinuiranih varijabli (npr. ekspresija gena i Breslov debljina), korišćen je Pirsonov koeficijent korelacije za normalno distribuirane podatke, dok je Spirmanov koeficijent korelacije ranga (eng. *Spearman's rank correlation coefficient*) korišćen za podatke koji nemaju normalnu distribuciju.

Za poređenje više grupa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (eng. *one-way analysis of variance, one-way ANOVA*), praćena Tukijevim ili Danetovim testom za višestruka poređenja, pod uslovom da su bile ispunjene pretpostavke normalnosti raspodele reziduala i homogenosti varijansi. Kada ove pretpostavke nisu bile ispunjene, primenjen je neparametarski Kruskal-Volisov test, praćen Danovim testom za višestruka poređenja. Za analizu istovremenog uticaja dva nezavisna faktora, kao i njihove međusobne interakcije, korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (eng. *two-way analysis of variance, two-way ANOVA*), praćena odgovarajućim testom za višestruka poređenja. Za analizu preživljavanja korišćen je Mantel-Koksov *log-rank* test.

Sve statističke analize su izvršene korišćenjem *GraphPad Prism* softvera verzije 8.0.1. Za sve navedene analize rezultati su smatrani statistički značajnim kada je *P*-vrednost bila < 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Analiza ekspresije, regulacije i uloge nišarina u uzorcima pacijenata

4.1.1. Kliničkopatohistološke karakteristike IORS kohorte

U ovom istraživanju je analizirano 30 uzoraka melanoma, od kojih je bilo 10 primarnih tumora, 12 metastaza iz limfnih čvorova i 8 udaljenih metastaza, i to 3 iz pluća, 2 iz slezine i 3 subkutane metastaze. Ispitivana grupa pacijenata sa melanomom operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS kohorta) obuhvatala je 18 muškaraca i 12 žena prosečne starosti 61 godinu (raspon godina 35-81, medijana 60,5). Detaljan opis kliničkih i patohistoloških karakteristika IORS kohorte prikazan je u tabeli 4.1. Za svaku ispitivanu kategoriju naveden je broj pacijenata u odgovarajućoj podgrupi, kao i njihov procentualni udeo u odnosu na ukupan broj pacijenata uključenih u kohortu, izražen kao *n* (%).

Tabela 4.1. Kliničke i histopatološke karakteristike melanoma pacijenata operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije

Karakteristike	***n* = 30 (100 %)**
Starost	
< 40	2 (6,7)
40-60	13 (43,3)
> 60	15 (50,0)
Pol	
Žene	12 (40,0)
Muškarci	18 (60,0)
Lokalizacija primarnog tumora	
Ekstremiteti	10 (33,3)
Trup	13 (43,3)
Glava i vrat	5 (16,7)
N.P.	2 (6,7)
Debljina (Breslov, u mm)	
≤1,0	3 (10,0)
1,01-2,0	4 (13,3)
2,01-4,0	6 (20,0)
>4,0	13 (43,3)
N.P.	4 (13,3)
Prisustvo ulceracije	
Da	10 (33,3)
Ne	11 (36,7)
N.P.	9 (30,0)

N.P. – nema podataka

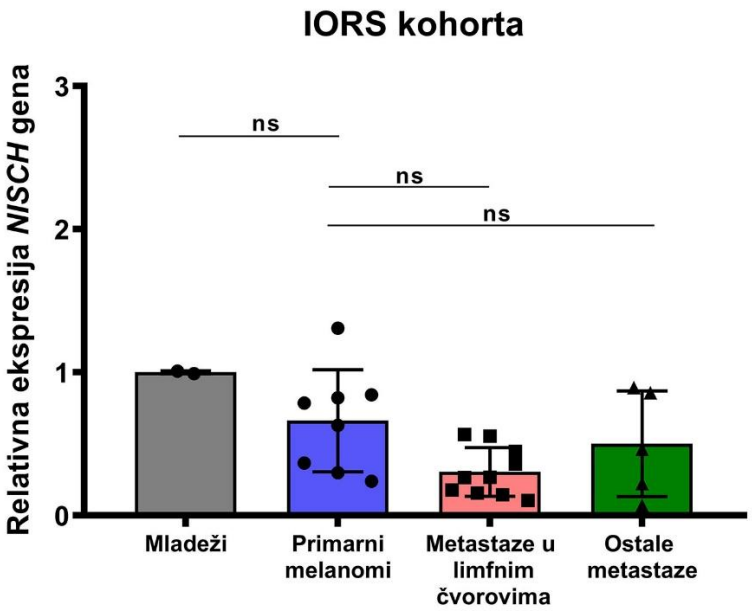
Tabela 4.1. Kliničke i histopatološke karakteristike melanoma pacijenata operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije - nastavak

Karakteristike	*n* = 30 (100 %)
Mitotski indeks (x/mm^2)	
0	1 (3,3)
1-4	9 (30,0)
5-10	6 (20,0)
≥11	5 (16,7)
N.P.	9 (30,0)
Nivo po Klarku	
II	1 (3,3)
III	9 (30,0)
IV	12 (40,0)
V	3 (10,0)
N.P.	5 (16,7)
Prisustvo regresije	
Da	0 (0)
Ne	12 (40,0)
N.P.	18 (60,0)
Limfociti koji infiltriraju tumor (eng. tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)	
Da	14 (46,7)
Ne	6 (20,0)
N.P.	10 (33,3)
Prisustvo vaskularne invazije	
Da	2 (6,7)
Ne	15 (50,0)
N.P.	13 (43,3)
Klinički stadijum	
Ib	2 (6,7)
IIa	2 (6,7)
IIb	1 (3,3)
III	4 (13,3)
IV	13 (43,3)
N.P.	8 (26,6)

N.P. – nema podataka

4.1.2. Ekspresija NISCH gena tokom progresije melanoma

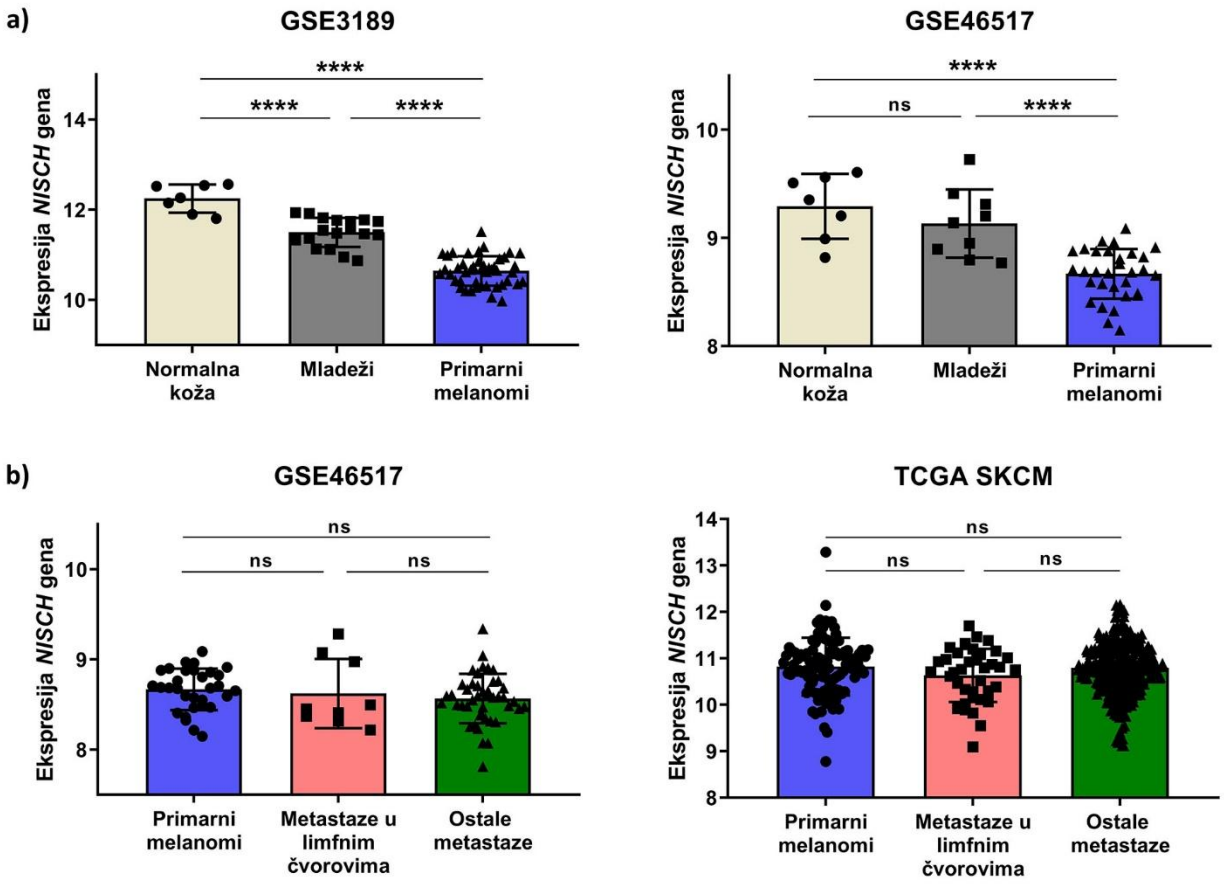
Ekspresija gena *NISCH* je najpre određena u uzorcima IORS kohorte. U svim grupama melanoma zabeležene su niže vrednosti ekspresije u odnosu na uzorke benignih mladeža, pri čemu je najniži nivo utvrđen u metastazama u limfnim čvorovima. Zbog izražene varijabilnosti i ograničenog broja uzoraka, razlike između grupa nisu dostigle statističku značajnost (Slika 4.1).



Slika 4.1. Grafički prikaz relativne ekspresije gena *NISCH* u uzorcima pacijenata sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, izmerene qPCR metodom i analizirane Kruskal-Volisov testom praćenim Danovim testom za višestruka poređenja, pri čemu su sve eksperimentalne grupe upoređivane u odnosu na grupu primarnih melanoma. ns – razlika nije statistički značajna.

Radi provere ovih nalaza, ekspresija gena *NISCH* dodatno je analizirana u javno dostupnim skupovima podataka koji obuhvataju uzorke normalne kože, benignih mladeža, primarnih melanoma i metastatskih lezija. U skupovima GSE3189 (Talantov et al., 2005) i GSE46517 (Kabbarah et al., 2010) ekspresija gena *NISCH* je bila značajno niža u primarnim melanomima nego u normalnoj koži i mladežima (Slika 4.2a). U skupu GSE3189 uočen je postepen pad ekspresije gena *NISCH* od najviših vrednosti u normalnoj koži, preko nižih vrednosti u mladežima, do najnižih vrednosti u primarnim melanomima. Sve razlike između analiziranih grupa bile su statistički značajne. Sličan obrazac zabeležen je i u skupu GSE46517, u kojem je ekspresija gena *NISCH* u primarnim melanomima bila značajno niža nego u normalnoj koži i mladežima. Iako su prosečne vrednosti ekspresije u mladežima bile blago niže nego u normalnoj koži, ova razlika nije dostigla statističku značajnost.

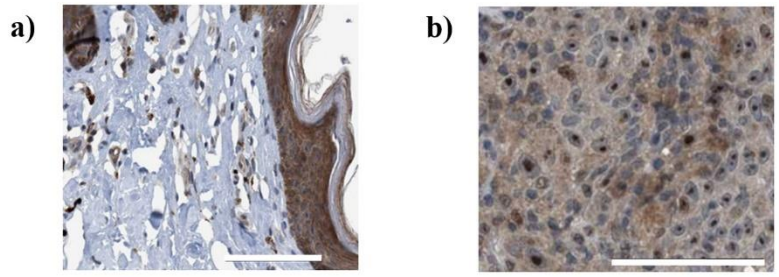
U narednom koraku ispitano je da li nakon nastanka primarnog melanoma dolazi do dodatne promene ekspresije gena *NISCH* tokom metastatske progresije (Slika 4.2b). Poređenjem primarnih melanoma sa metastazama u limfnim čvorovima i metastazama u drugim anatomskim lokalizacijama u skupovima podataka GSE46517 i TCGA SKCM nisu utvrđene značajne razlike u nivou ekspresije gena *NISCH*. Ovi rezultati pokazuju da se najizraženije smanjenje ekspresije gena *NISCH* javlja pri nastanku primarnog melanoma, dok u analiziranim javno dostupnim skupovima podataka nije uočeno njeno dalje značajno smanjenje tokom prelaska iz primarnog u metastatski stadijum bolesti.



Slika 4.2. Ekspresija *NISCH* gena u (a) benignim tkivima i uzorcima primarnih melanoma u setovima podataka GSE3189 i GSE46517 i (b) primarnim melanomima i metastazama u setovima GSE46517 i TCGA SKCM. Podaci su $\log_2$ transformisani, a zatim analizirani koristeći jednofaktorsku analizu varijanse sa Tukijevim testom za višestruka poređenja. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns – nije značajno.

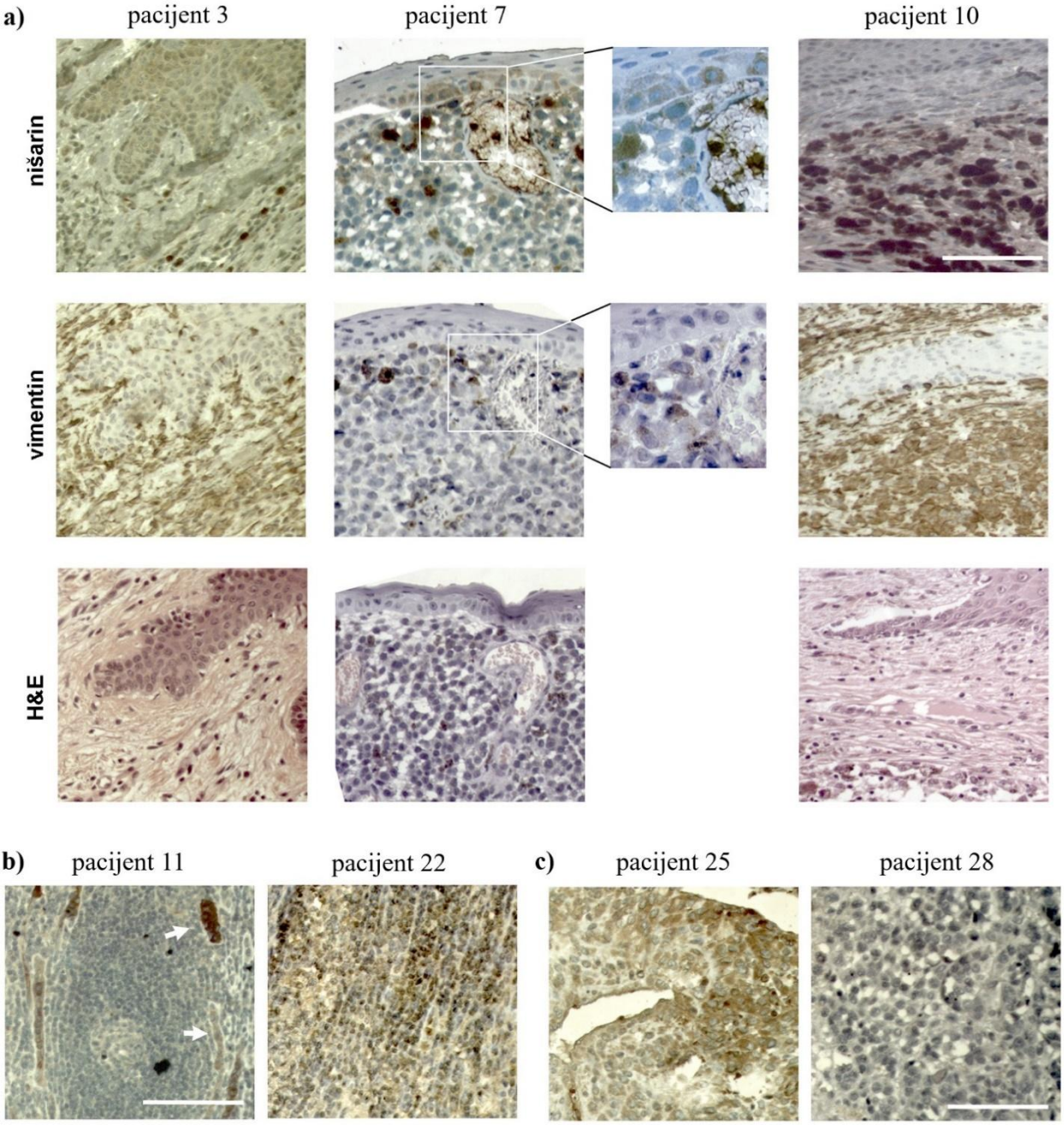
4.1.3. *Ekspresija proteina nišarina*

Ekspresija proteina nišarina i njegova subćelijska lokalizacija ispitane su korišćenjem podataka iz baze *Human Protein Atlas* i imunohistohemijski obojenih uzoraka IORS kohorte. Prema podacima iz *Human Protein Atlas* baze, visoka ekspresija nišarina je u zdravoj koži bila prisutna u melanocitima, keratinocitima i Langerhansovim ćelijama, dok je u fibroblastima zabeležen umeren intenzitet bojenja. U svim ovim ćelijama je NISCH protein bio lokalizovan u citoplazmi i na membrani, što je u skladu sa do sada poznatim funkcijama ovog proteina (Slika 4.3a). U melanomskim uzorcima iz *Human Protein Atlas* baze, slaba ekspresija nišarina je zabeležena u polovini analiziranih uzoraka, a nasuprot raspodeli opisanoj u zdravoj koži, u 75 % uzoraka melanoma je zabeleženo i nukleusno bojenje (Slika 4.3b).



Slika 4.3. Proteinska ekspresija i lokalizacija nišarina u (a) normalnoj koži i (b) uzorku melanoma, analizirana antitelom HPA023189. Preuzeto iz *Human Protein Atlas* baze. Skala: 100 μm.

U primarnim melanomima IORS kohorte nišarin je detektovan u epidermalnom i dermalnom kompartmentu, a u dermisu je bio prisutan i u citoplazmi i u jedrima ćelija (Slika 4.4a). Ekspresija nišarina je potvrđena i u metastazama u limfnim čvorovima (Slika 4.4b), kao i u udaljenim metastazama (Slika 4.4c), u kojima je takođe uočena kombinovana citoplazmatska i nukleusna lokalizacija. Za morfološku orijentaciju i razlikovanje tumorskog tkiva od okolnih stromalnih elemenata koje čine fibroblasti, komponente ekstracelularnog matriksa i vaskularne strukture, korišćeni su uzastopni preseci bojeni na vimentin i hematoksilin-eozin (H&E). Proteinska ekspresija nišarina u uzorcima pacijenata IORS kohorte je odgovarala nivou ekspresije gena *NISCH* koji je određen qPCR metodom.

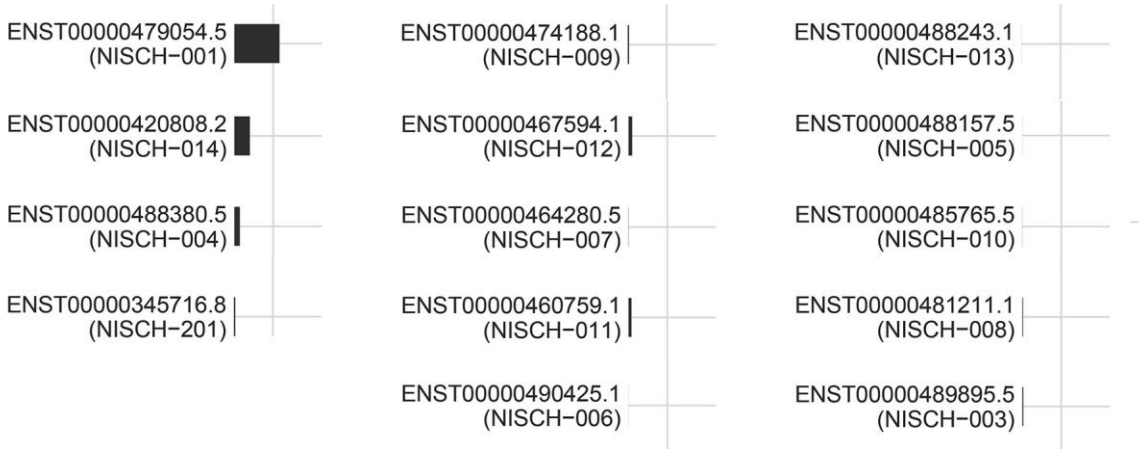


Slika 4.4. Proteinska ekspresija nišarina u uzorcima melanoma pacijenata operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. (a) Imunohistohemijska detekcija NISCH i vimentina i H&E bojenje su izvršeni na uzastopnim presecima primarnih melanoma iz IORS kohorte. Umetnute slike predstavljaju uvećane prikaze područja označenih pravougaonikom kod pacijenta 7. Nišarin je detektovan i u uzorcima (b) metastaza u limfnim čvorovima (bele strelice označavaju tumorske depozite) i (c) udaljenih metastaza. Skala: 100 μm.

4.1.4. Ekspresija i zastupljenost transkripata NISCH gena

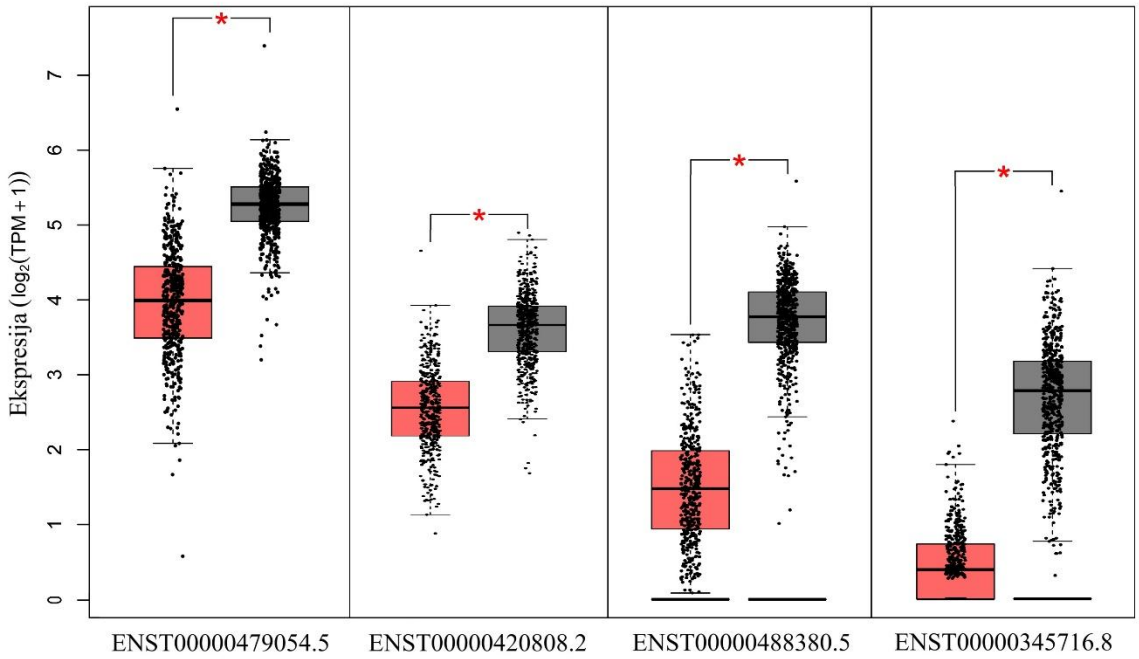
Analizom zastupljenosti izoformi gena *NISCH* na GEPIA2 platformi utvrđen je profil distribucije transkripata u tkivima melanoma iz SKCM TCGA seta podataka. Identifikovana su 4 protein-kodirajuća transkripta: ENST00000479054.5, ENST00000488380.5, ENST00000420808.2 i ENST00000345716.8, kao i 10 nekodirajućih transkripata. Dva od četiri protein-kodirajuća

transkripta, ENST00000479054.5 i ENST00000345716.8, kodiraju kanonsku izoformu 1 koja predstavlja funkcionalni protein pune dužine od 1504 aminokiseline (*NISCH - Nischarin - Homo Sapiens (Human)* | *UniProtKB*, n.d.). Preostala dva transkripta, ENST00000420808.2 i ENST00000488380.5, kodiraju skraćene proteinske varijante, tj. izoformu 3 (IRAS-L) i izoformu 4 (IRAS-S), redom.



Slika 4.5. Grafikon zastupljenosti izoformi u ukupnoj ekspresiji gena *NISCH* u tkivima melanoma TCGA SKCM seta podataka. Levo su izdvojeni protein-kodirajući transkripti gena *NISCH*, dok su u sredini i desno prikazani ostali transkripti. Dužina sivih polja predstavlja relativnu zastupljenost pojedinačnih transkripata u rasponu od 0 do 100 %, pri čemu centralna vertikalna linija označava 50 % relativnog udela transkripta.

Transkript ENST00000479054.5, koji kodira kanonsku izoformu 1, predstavlja najzastupljeniju izoformu u tkivu melanoma, čineći ubedljivo najveći procenat ukupne transkripcije gena *NISCH*. Za njim slede transkripti ENST00000420808.2 i ENST00000488380.5 sa umerenim udelom u ukupnom profilu ekspresije, dok transkript ENST00000345716.8 čini minimalan udeo. Ostali transkripti su imali zanemarljivu zastupljenost u TCGA SKCM uzorcima.

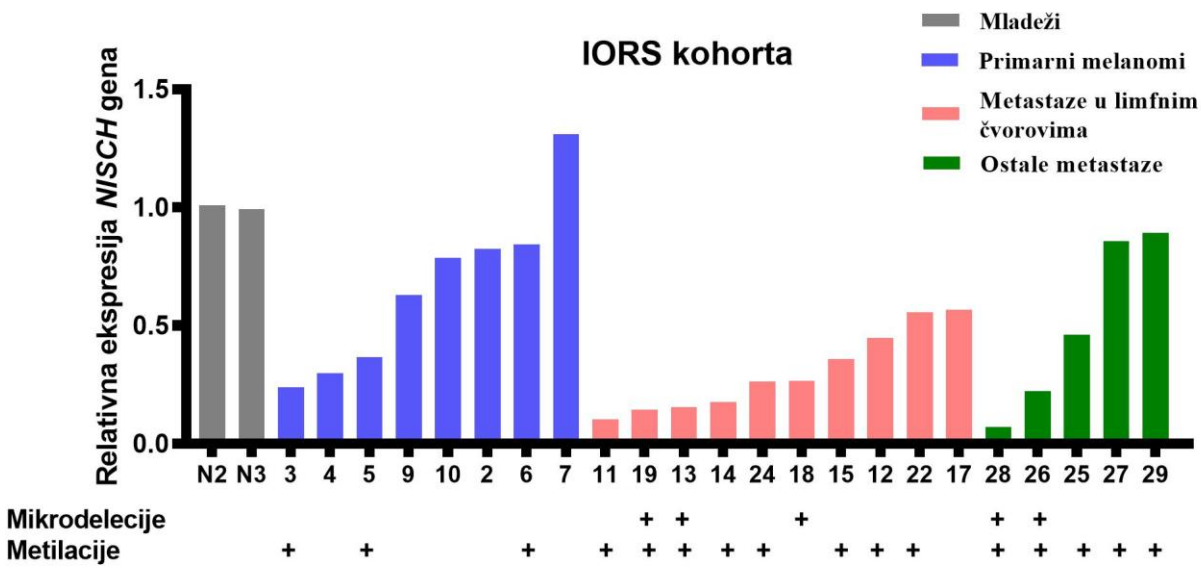


Slika 4.6. Ekspresioni profil protein-kodirajućih transkripata gena *NISCH* u uzorcima melanoma (crvene boje) i odgovarajućeg normalnog tkiva kože (sive boje). Svaka tačka na dijagramu predstavlja pojedinačni uzorak. Zvezdica iznad grafikona ukazuje na statistički značajno smanjenje ekspresije transkripta u tumorskom tkivu u poređenju sa zdravim tkivom ($P < 0,01$, $|\log_2 FC| \geq 1$). Preuzeto i adaptirano sa GEPIA2 platforme.

Analizom razlika u ekspresiji za četiri protein-kodirajuća transkripta gena *NISCH* poređenjem TCGA SKCM uzoraka tumora i odgovarajućih zdravih tkiva kože iz GTEx baze, uočeno je statistički značajno smanjenje nivoa ekspresije u tkivu melanoma u poređenju sa zdravim tkivom kože (Slika 4.6). Najviši nivo ekspresije u oba tkiva imao je kanonski transkript ENST00000479054.5, čija je medijana ekspresije iznosila 37,84 transkripata po milionu (eng. *Transcripts Per Million*, TPM) u zdravom tkivu, a značajno manje, 14,91 TPM, u melanomu (podaci preuzeti sa GEPIA2 platforme). Transkript ENST00000488380.5 pokazao je takođe veliku razliku u ekspresiji i smanjenje sa 12,49 TPM u zdravom tkivu u odnosu na 1,77 TPM u melanomu, a transkript ENST00000420808.2 pad sa 11,64 TPM na 4,88 TPM. Najnižu apsolutnu ekspresiju imao je transkript ENST00000345716.8, koji je zabeležio pad medijane ekspresije sa 5,85 TPM u kontrolnom na 0,31 TPM u tumorskom tkivu. Ovakav opšti, uniformni pad transkripcije svih kodirajućih izoformi ukazuje da je u tkivu melanoma prisutno globalno utišavanje transkripcione aktivnosti gena *NISCH*.

4.1.5. Regulacija ekspresije gena NISCH u melanomu

Nakon utvrđenog konzistentnog smanjenja ekspresije gena *NISCH* i svih njegovih protein-kodirajućih transkripata u melanomu u poređenju sa zdravom kožom i benignim mladežima, analizirane su genetičke i epigenetičke promene koje bi mogle doprineti njegovoj smanjenoj transkripciji.

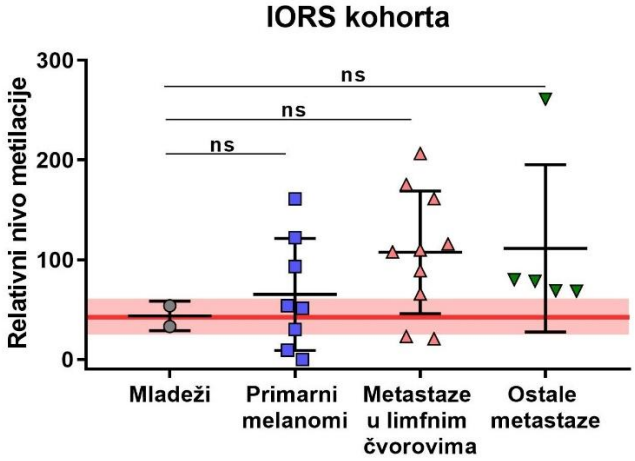


Slika 4.7. Nivoi relativne ekspresije gena *NISCH* u uzorcima pacijenata operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, sa naznačenim prisustvom mikrodelecija i hipermetilacije promotora *NISCH* gena.

U uzorcima IORS kohorte, mikrodelecije nisu detektovane u primarnim melanomima, dok su bile prisutne u 30 % metastaza u limfnim čvorovima i 40 % udaljenih metastaza (Slika 4.7). Njihova pojava u uzorcima sa nižom ekspresijom ukazuje na to da gubitak delova gena može doprineti smanjenju nivoa *NISCH* transkripta u metastatskim lezijama. Međutim, iako su relativno često uočene u metastatskim uzorcima analizirane kohorte, ovaj nalaz treba tumačiti sa oprezom s obzirom na ograničen broj uzoraka. Pored toga, mikrodelecije nisu bile konzistentno prisutne u svim uzorcima sa sniženom ekspresijom gena *NISCH*, što ukazuje da one verovatno ne predstavljaju jedini ili dominantan mehanizam odgovoran za smanjenje *NISCH* ekspresije u melanomu.

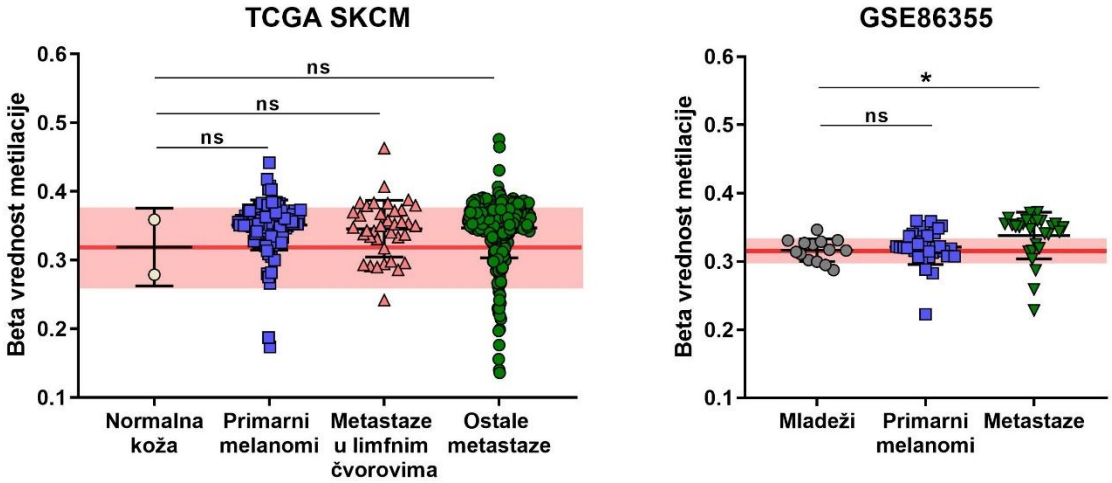
Povećana metilacija promotorske regije *NISCH* gena u odnosu na mladeže detektovana je u 3 od 8 primarnih melanoma, 8 od 10 metastaza u limfnim čvorovima i svih 5 uzoraka udaljenih metastaza (Slika 4.7). Iako poređenjem grupa nije utvrđena ukupna statistički značajna razlika, uočen je porast metilacije tokom progresije bolesti. Ova tendencija bila je naročito izražena u metastazama u limfnim čvorovima, grupi u kojoj su registrovane i najniže vrednosti ekspresije gena *NISCH* (Slike 4.7 i 4.8).

Dobijeni rezultati ukazuju da i mikrodelecije i hipermetilacija mogu biti potencijalni mehanizmi smanjenja ekspresije nišarina u metastazama, dok je u primarnim melanomima od ove dve ispitivane vrste promena zabeležena samo povećana metilacija promotorske regije. Zajedničko prisustvo mikrodelecija gena *NISCH* i povećane metilacije njegove promotorske regije u pojedinim metastatskim uzorcima pokazuje da se ovi mehanizmi međusobno ne isključuju.



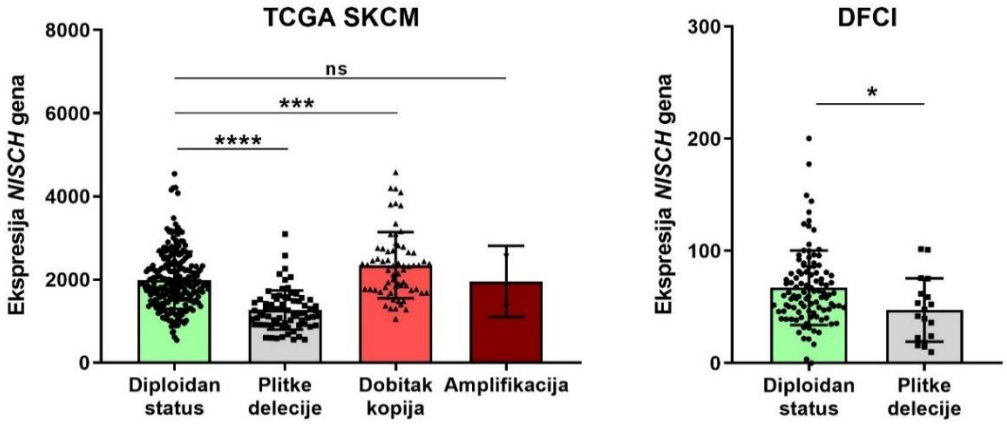
Slika 4.8. Relativni nivo metilacije *NISCH* gena u IORS kohorti. Uzorci sa relativnim nivoom metilacije višim od srednje vrednosti nivoa metilacije izmerene u mladežima i uvećane za jednu standardnu devijaciju klasifikovani su kao hipermetilovani u poređenju sa benignim tkivom. Podaci su analizirani koristeći Kruskal-Volisov test sa Danovim testom za višestruka poređenja. ns – razlika nije statistički značajna.

Analiza javno dostupnih podataka nije pokazala značajne razlike u prosečnim β-vrednostima promotorske regije gena *NISCH* između normalne kože, primarnih melanoma i različitih grupa metastaza u TCGA SKCM kohorti. Nasuprot tome, u skupu GSE86355 je uočen postepen porast metilacije tokom progresije melanoma, a metastatski uzorci imali su blago, ali statistički značajno više vrednosti od benignih mladeža (Slika 4.9).



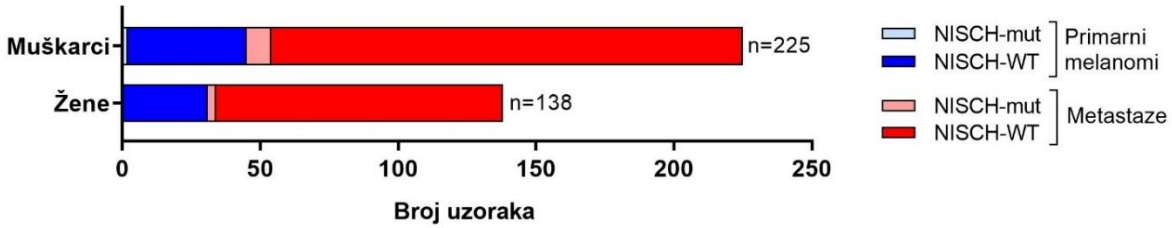
Slika 4.9. Metilacioni status promotorskog regiona gena *NISCH* u javno dostupnim skupovima podataka TCGA SKCM i GSE86355. Prikazane su srednje β-vrednosti CpG proba lociranih unutar CpG ostrvaca u regionu TSS1500 gena *NISCH*. Svaki simbol predstavlja pojedinačni uzorak. Crvena horizontalna linija označava srednju β-vrednost referentne grupe, dok osenčeni opseg predstavlja srednju vrednost ± standardnu devijaciju. U skupu TCGA SKCM kao referentna grupa korišćeni su uzorci normalne kože, a u skupu GSE86355 uzorci benignih melanocitnih nevusa. Podaci su analizirani koristeći jednofaktorsku analizu varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja. * $P < 0,05$; ns – razlika nije statistički značajna.

Pošto su gubitak heterozigotnosti i mikrodelecije ranije opisani kao mogući mehanizmi smanjenja ekspresije nišarina u tumorskom tkivu dojke (Baranwal et al., 2011), analizirane su i promene broja kopija gena *NISCH* u TCGA SKCM i DFCI skupovima metastatskih melanoma (Slika 4.10). Plitke delecije su bile prisutne u približno 20 % TCGA SKCM i 15 % DFCI uzoraka. Uzorci u kojima je zabeleženo prisustvo plitkih delecija su i u TCGA SKCM i u DFCI setu podataka imali nižu ekspresiju gena *NISCH* od diploidnih uzoraka. Povećanje broja kopija u TCGA SKCM uzorcima je bilo povezano sa višim nivoom ekspresije, dok kod malog broja uzoraka sa amplifikacijom nije utvrđeno odgovarajuće značajno povećanje ekspresije.



Slika 4.10. Somatske alteracije broja kopija *NISCH* gena u javno dostupnim setovima podataka TCGA SKCM i DFCI. Podaci su analizirani koristeći jednofaktorsku analizu varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja ili Studentov *t*-test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

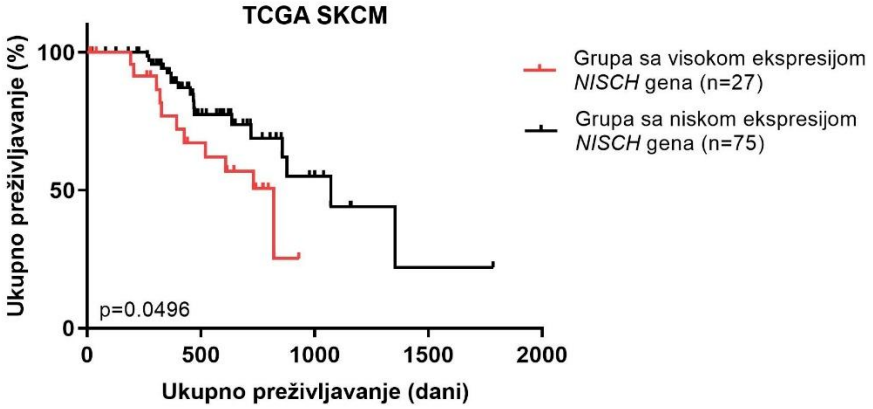
Dodatno je analiziran i mutacioni status koji je pokazao da su mutacije gena *NISCH* relativno retke. Detektovane su u 3,86 % analiziranih TCGA SKCM uzoraka, odnosno u 2 od 76 primarnih i 12 od 287 metastatskih melanoma, kao i u 5,79 % DFCI uzoraka, odnosno u 7 od 121 metastatskog melanoma. Deskriptivna analiza TCGA podataka pokazala je da su oba mutirana primarna tumora i 9 od 12 mutiranih metastatskih uzoraka poticali od muških pacijenata (Slika 4.11). Zbog malog broja mutiranih uzoraka ovaj nalaz treba smatrati eksplorativnim.



Slika 4.11. Pregled mutacionog statusa *NISCH* gena u uzorcima primarnog melanoma i metastaza u TCGA SKCM setu podataka. Uzorci sa detektovanom mutacijom su označeni sa NISCH-mut, dok NISCH-WT označava da je *NISCH* gen nepromenjen.

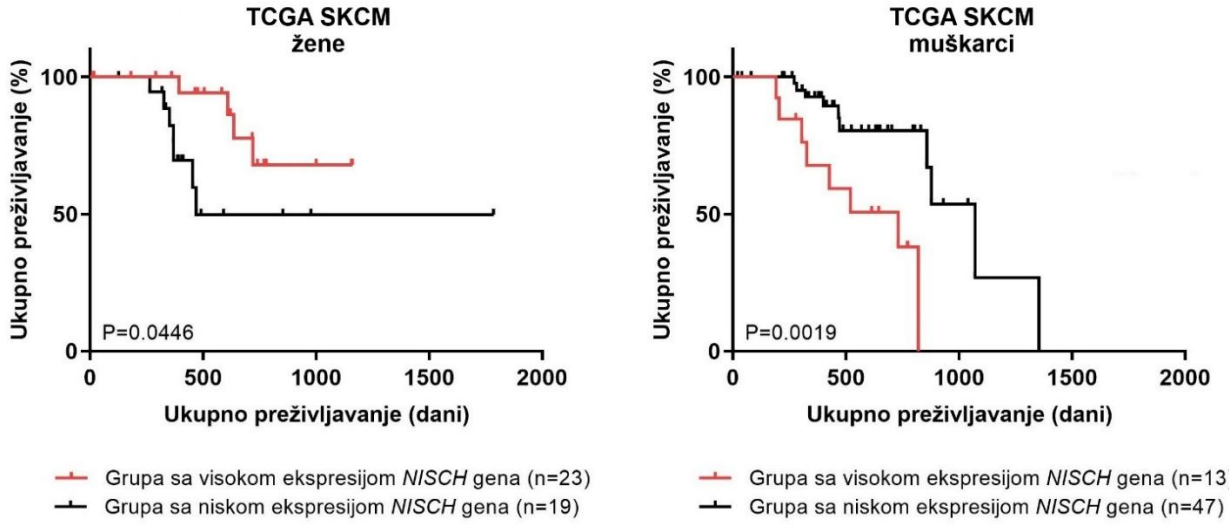
4.1.6. Analiza ukupnog preživljavanja pacijenata

Pacijenti sa primarnim melanomom podeljeni su na grupe sa višom i nižom ekspresijom gena *NISCH* primenom optimalne granične vrednosti koja je davala najveću razliku između Kaplan-Majerovih krivih. U analizi svih pacijenata, viša ekspresija bila je povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem prema log-rank testu (P = 0,0496; odnos rizika (eng. *hazard ratio*) HR = 2,05; 95 % CI: 0,8629-4,871) (Slika 4.12).



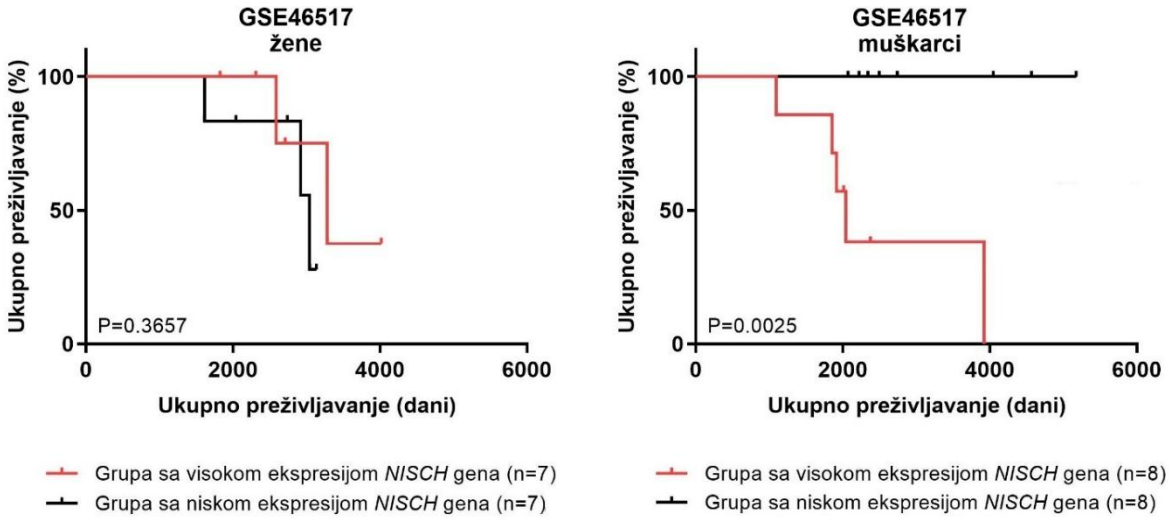
Slika 4.12. Kaplan-Majerova kriva ukupnog preživljavanja za pacijente sa primarnim melanomom iz TCGA SKCM seta. Podela ispitanika je izvršena na osnovu optimalne granične vrednosti ekspresije gena *NISCH* (11,8 FPKM) određene prema podacima Human Protein Atlas baze.

Kako je ovakav rezultat bio suprotan povoljnoj prognostičkoj povezanosti nišarina opisanoj u karcinomu dojke i jajnika (Baranwal et al., 2011; J. Li et al., 2015), analiza je ponovljena odvojeno kod ženskih i muških pacijenata.



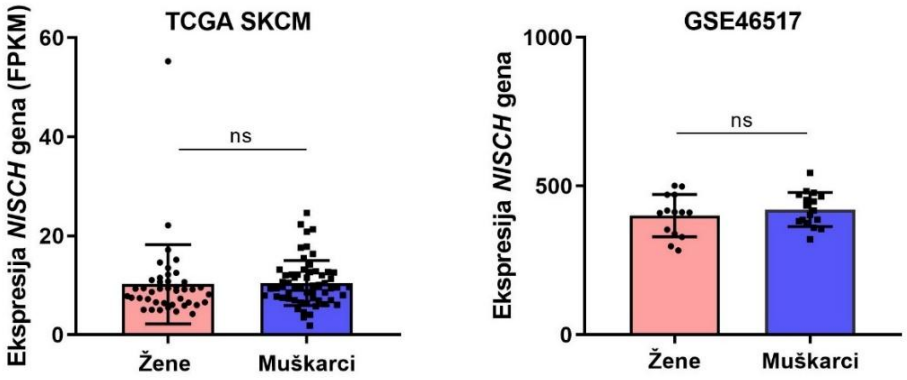
Slika 4.13. Analiza ukupnog preživljavanja izvršena je za novodefinisane grupe ispitanika formirane na osnovu optimalnih graničnih vrednosti ekspresije gena *NISCH*, zasebno za žene (8,23 FPKM) i muškarce (12,7 FPKM).

Kod žena je viša ekspresija gena *NISCH* bila povezana sa boljim ukupnim preživljavanjem prema log-rank testu (*P* = 0,0446; HR = 0,3116; 95 % CI: 0,09046-1,073). Kod muškaraca je uočena suprotna povezanost, pri čemu su pacijenti sa višom ekspresijom imali lošije ukupno preživljavanje (*P* = 0,0019; HR = 3,738; 95 % CI: 1,112-12,57) (Slika 4.13). Analiza skupa GSE46517 dodatno je podržala postojanje razlike u prognostičkoj povezanosti ekspresije gena *NISCH* između polova, iako nalaze treba tumačiti u skladu sa ograničenom veličinom ove kohorte (Slika 4.14).



Slika 4.14. Uticaj ekspresije nišarina na ukupno preživljavanje pacijenata sa melanomom u skupu podataka GSE46517. Primarni uzorci melanoma podeljeni su u grupe sa visokom i niskom ekspresijom gena *NISCH*, pri čemu je podela izvršena na osnovu medijane vrednosti ekspresije, posebno za žene i muškarce.

Nivoi ekspresije gena *NISCH* nisu se značajno razlikovali između ženskih i muških pacijenata ni u jednom analiziranom skupu podataka, što pokazuje da različite krive preživljavanja nisu posledica prostih razlika u prosečnom nivou ekspresije između polova (Slika 4.15).



Slika 4.15. Razlika u nivoima ekspresije gena *NISCH* između ženskih i muških pacijenata sa primarnim melanomom za koje je prethodno određena prognostička vrednost nišarina.

4.1.7. Povezanost ekspresije gena NISCH sa kliničkopatološkim parametrima

Zbog ograničene veličine IORS kohorte povezanost ekspresije gena *NISCH* sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama ispitana je u primarnim melanomima iz TCGA SKCM skupa. Imajući u vidu razlike u analizama preživljavanja, ženski i muški pacijenti analizirani su odvojeno (Tabela 4.2). Prosečna starost pacijentkinja iznosila je 66,7 godina, uz raspon od 36 do 90 godina i medijanu od 70,5 godina. Kod muškaraca je prosečna starost iznosila 63 godine, uz raspon od 24 do 90 godina i medijanu od 63 godine.

Tabela 4.2. Korelacije ekspresije *NISCH* gena u odnosu na karakteristike pacijenata sa primarnim melanomom i patohistološke parametre bolesti

TCGA SKCM podaci	Žene		Muškarci	
Karakteristike	**n = 42 (100 %)**	**P-vrednost**	**n = 60 (100 %)**	**P-vrednost**
Starost				
< 40	1 (2,4)		4 (6,7)	
40-60	13 (31,0)	ns[a]	20 (33,3)	ns[a]
> 60	28 (66,6)		36 (60,0)	
Lokalizacija primarnog tumora				
Ekstremiteti	21 (50,0)		20 (33,3)	
Trup	17 (40,5)	ns[b]	29 (48,3)	ns[b]
Glava i vrat	2 (4,8)		6 (10,0)	
N.P.	2 (4,8)		5 (8,3)	
Debljina (Breslov, u mm)				
≤1,0	/		1 (1,7)	
1,01-2,0	1 (2,4)		4 (6,7)	
2,01-4,0	4 (9,5)	ns[a]	5 (8,3)	ns[a]
>4,0	34 (81,0)		43 (71,7)	
N.P.	3 (7,1)		7 (11,7)	
Prisustvo ulceracije				
Da	27 (64,3)		5 (8,3)	
Ne	8 (19,0)	ns[c]	48 (80,0)	ns[c]
N.P.	7 (16,7)		7 (11,7)	
Mitotski indeks (x/mm^2)				
0	1 (2,4)		/	
1-4	/		10 (16,7)	
5-10	3 (7,1)	ns[a]	4 (6,7)	ns[a]
≥11	/		2 (3,3)	
N.P.	38 (90,5)		44 (73,3)	
Nivo po Klarku				
II	/		1 (1,7)	
III	3 (7,1)		11 (18,3)	
IV	14 (33,3)	ns[b]	24 (40,0)	ns[b]
V	14 (33,3)		7 (11,7)	
N.P.	11 (26,2)		17 (28,3)	
Klinički stadijum				
I	1 (2,4)		1 (1,7)	
II	26 (61,9)		39 (65,0)	
III	13 (31,0)	ns[b]	14 (23,3)	ns[b]
IV	1 (2,4)		2 (3,3)	
N.P.	1 (2,4)		4 (6,7)	

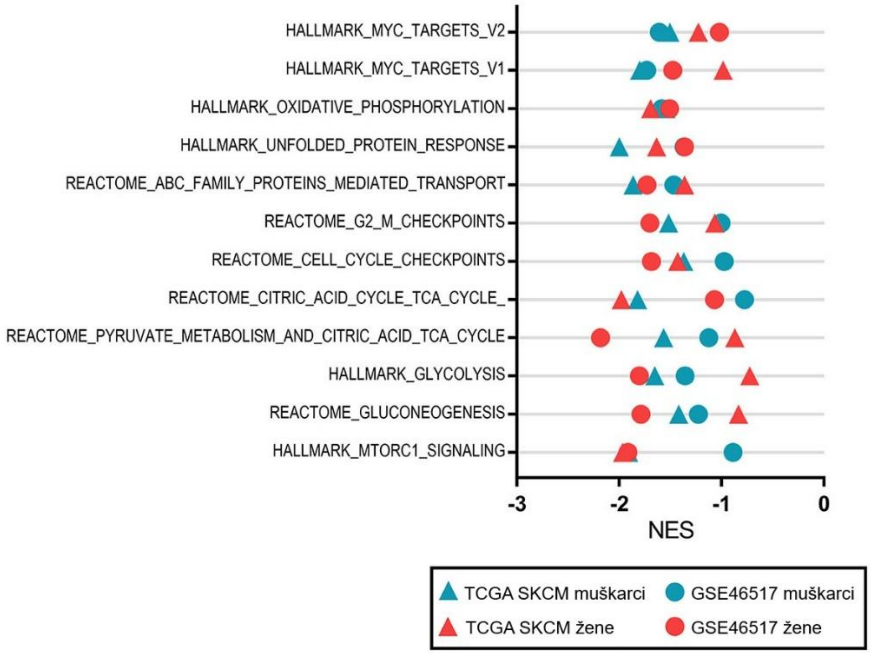
N.P. – nema podataka; [a] Spirmanova korelacija; [b] Kruskal-Volisov test sa Danovim testom za višestruka poređenja; [c] Man-Vitnijev test

Ni kod žena ni kod muškaraca nije utvrđena značajna korelacija između ekspresije gena *NISCH* i starosti pacijenata. Nisu uočene ni značajne razlike u odnosu na anatomsku lokalizaciju primarnog tumora, debljinu melanoma, prisustvo ulceracije, mitotski indeks, Klarkov nivo invazije ili stadijum bolesti. Odsustvo značajnih povezanosti treba tumačiti oprezno zbog malog broja uzoraka u pojedinim kategorijama i njihove neravnomerne raspodele.

4.1.8. Genske mreže povezane sa ekspresijom gena NISCH

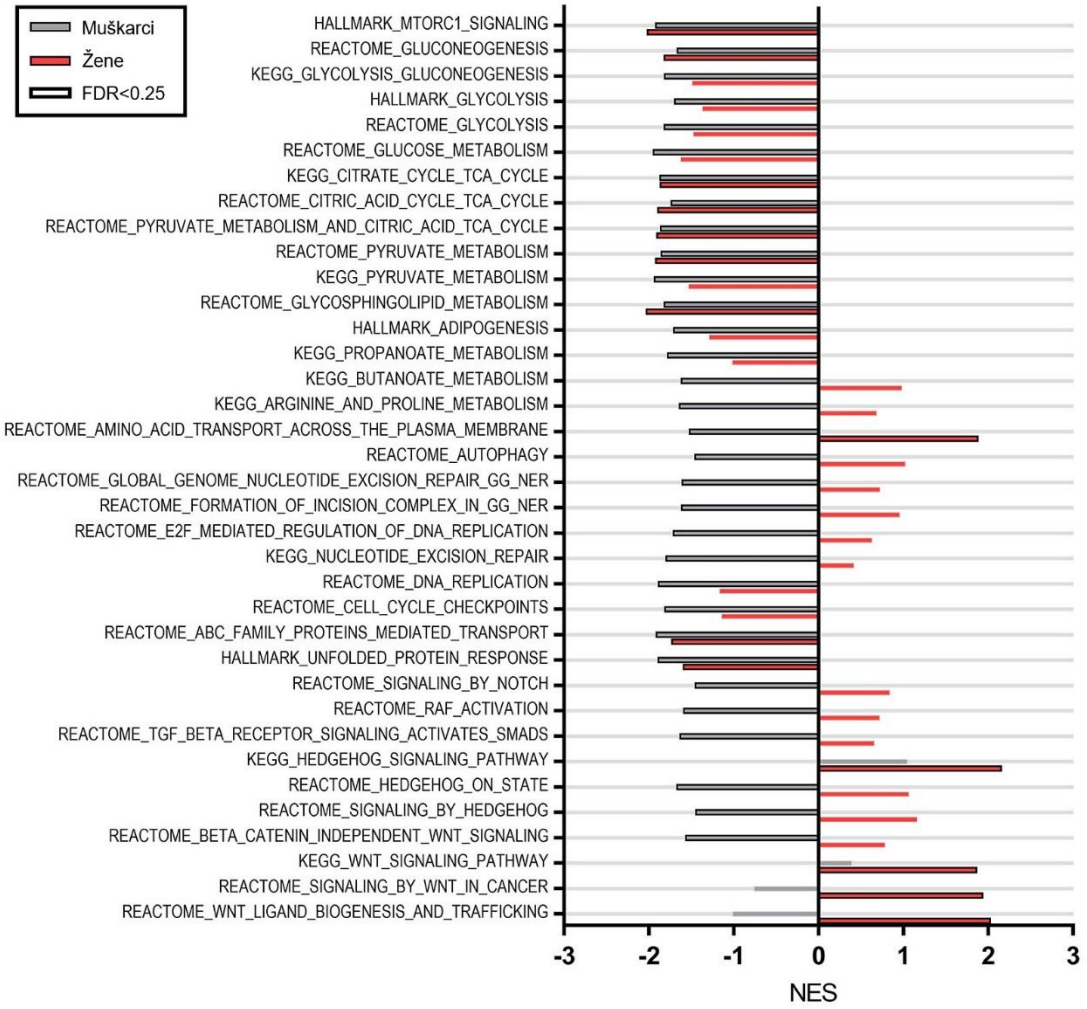
Radi ispitivanja bioloških procesa koji bi mogli biti povezani sa različitim prognostičkim značajem gena *NISCH* kod žena i muškaraca, sprovedena je analiza obogaćenosti genskih skupova (GSEA). Analize TCGA SKCM i GSE46517 skupova izvedene su odvojeno za svaki pol, korišćenjem kolekcija *Hallmark*, *KEGG* i *Reactome*.

Kod oba pola porast ekspresije gena *NISCH* je bio povezan sa negativnim obogaćivanjem genskih skupova koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa i metabolizma (Slika 4.16). Među njima su bili skupovi povezani sa G_2/M (*Reactome G2/M Checkpoints*) i drugim kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa (*Reactome Cell Cycle Checkpoints*), kao i ciljni geni protoonkogena MYC (eng. *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*) *Hallmark MYC Targets*, što je konzistentno sa inhibicijom brzog ćelijskog rasta. Negativna povezanost je uočena i za metaboličke puteve, uključujući oksidativnu fosforilaciju (*Hallmark Oxidative Phosphorylation*), glikolizu (*Hallmark Glycolysis*), glukoneogenezu (*Reactome Gluconeogenesis*), kao i ključne procese u mitohondrijama poput ciklusa limunske kiseline (*Reactome Citric Acid Cycle TCA Cycle*) i metabolizma piruvata (*Reactome Pyruvate Metabolism and Citric Acid TCA Cycle*). Putanja signalizacije mTOR kompleksa 1 (*Hallmark MTORC1 Signaling*), koja je centralni regulator rasta ćelije i sinteze proteina, takođe pokazuje negativnu korelaciju sa nivoima *NISCH* gena. Sličan obrazac zabeležen je za odgovor na nepravilno savijene proteine (*Hallmark Unfolded Protein Response* - UPR) i transport posredovan proteinima ABC (eng. *ATP-binding cassette*) porodice (*Reactome ABC Family Proteins Mediated Transport*).



Slika 4.16. Pregled zajedničkih obogaćenih genskih skupova (GSEA) u TCGA SKCM i GSE46517 kohortama, prikazanih odvojeno prema polu pacijenata. Prikazani su zajednički signalni putevi iz *Hallmark* i *Reactome* kolekcija. Svi prikazani putevi imaju negativan normalizovani skor obogaćenosti (NES), odnosno negativnu povezanost sa ekspresijom gena *NISCH*.

Analiza ograničena na TCGA SKCM kohortu potvrdila je negativnu povezanost visoke ekspresije gena *NISCH* sa mTORC1 signalizacijom, glikolizom, glukoneogenezom, ciklusom limunske kiseline, metabolizmom piruvata i adipogenezom kod oba pola (Slika 4.17). Istovremeno su identifikovani genski skupovi čija se povezanost sa ekspresijom gena *NISCH* razlikovala između žena i muškaraca. Najizraženije polno specifične razlike odnosile su se na *Hedgehog* (*Kegg Hedgehog Signaling Pathway*) i *WNT* signalizaciju (*Reactome Beta-catenin Independent Wnt Signaling, Kegg Wnt Signaling Pathway, Reactome Signaling by Wnt in Cancer*), kao i na biogenezu i transport *WNT* liganada (*Reactome Wnt Ligand Biogenesis and Trafficking*). Ovi skupovi bili su pozitivno povezani sa višom ekspresijom gena *NISCH* kod žena, dok odgovarajuća pozitivna povezanost nije utvrđena kod muškaraca. Kod muškaraca je viša ekspresija bila negativno povezana sa autofagijom (*Reactome Autophagy*) i putevima nukleotidne ekscizione reparacije DNK (eng. *nucleotide excision repair*, NER): *Kegg Nucleotide Excision Repair, Reactome Global Genome Nucleotide Excision Repair GG NER, Reactome Formation of Incision Complex in GG NER*.



Slika 4.17. Rezultati GSEA analize za TCGA SKCM uzorke primarnih melanoma koji su podeljeni na podskupove žena i muškaraca. NES = normalizovani skor obogaćenja, FDR = stopa lažnih otkrića. Za granicu statističke značajnosti u GSEA analizi važi FDR < 0,25. NES < 0 označava negativnu, a NES > 0 pozitivnu korelaciju sa ekspresijom gena *NISCH*.

Većina pojedinačnih gena *WNT* familije pokazala je izraženu pozitivnu korelaciju sa ekspresijom gena *NISCH* kod pacijentkinja, za razliku od analizirane grupe muških pacijenata (Slika 4.18). Ovi rezultati ukazuju da je ekspresija gena *NISCH* povezana sa metaboličkom plastičnošću melanoma, pri čemu se obrasci povezanosti sa metaboličkim i signalnim putevima razlikuju u zavisnosti od pola pacijenata.

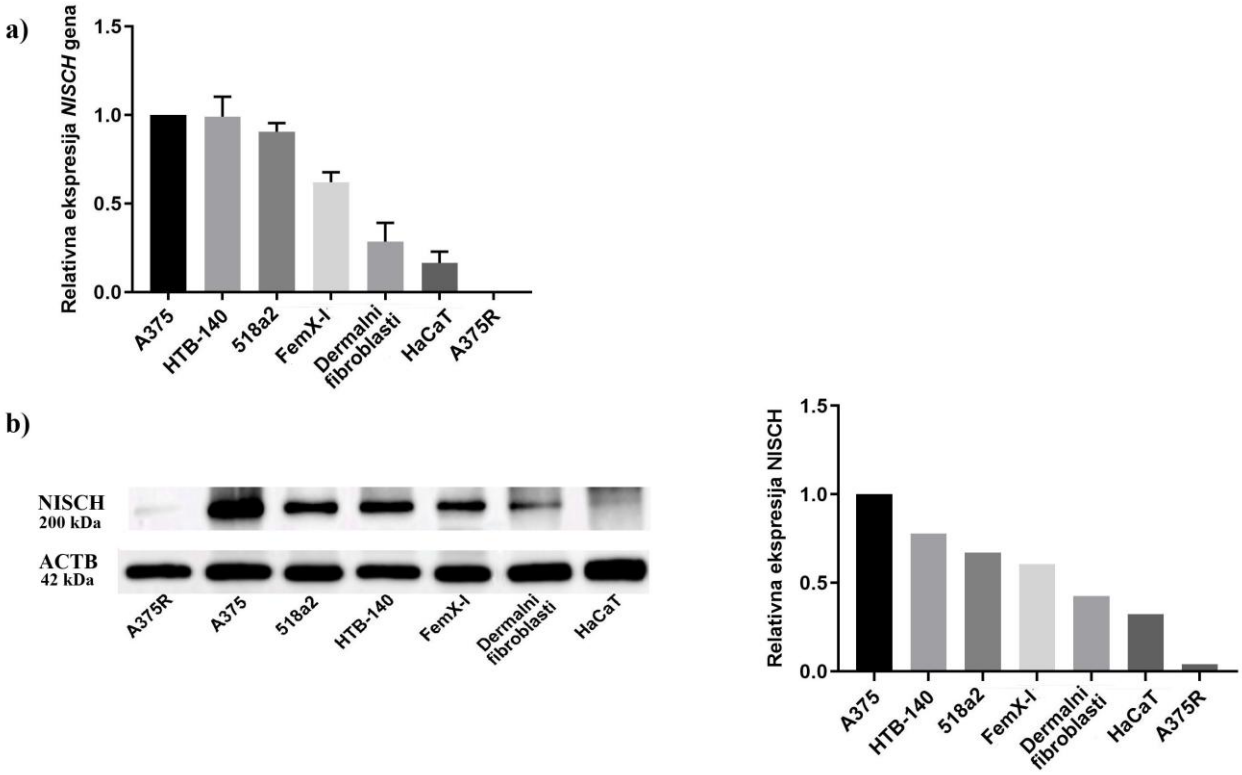
TCGA SKCM	GSEA skor rangiranja	
Naziv gena	Žene	Muškarci
WNT8B	0.903	0.063
WNT6	0.893	0.106
WNT3A	0.877	-0.069
WNT8D	0.875	-0.116
WNT7B	0.846	-0.088
WNT2B	0.829	0.099
WNT7A	0.795	-0.114
WNT10A	0.764	-0.038
WNT9B	0.678	-0.053
WNT3	0.671	-0.076
WNT4	0.454	0.145
WNT1	0.314	-0.184
WNT5B	0.310	0.005
WNT16	0.085	-0.125
WNT11	0.045	-0.040
WNT2	-0.129	-0.164

Slika 4.18. Korelacija između *NISCH* i *WNT* gena na osnovu skorova rangiranja dobijenih GSEA analizom, koristeći Pirsonovu korelaciju u TCGA SKCM skupu podataka. Rezultati su prikazani na toplotnoj mapi, pri čemu crvena boja označava pozitivnu, a plava negativnu korelaciju.

4.2. Potencijal imidazolinskih I_1 agonista za prenamenu u lečenju melanoma

4.2.1. Bazalna ekspresija nišarina u ćelijskim linijama

Bazalni nivoi ekspresije gena i proteina nišarina u panelu ćelijskih linija melanoma i netumorskih ćelija kože određeni su qPCR i *Western* blot metodama i prikazani na Slici 4.19.

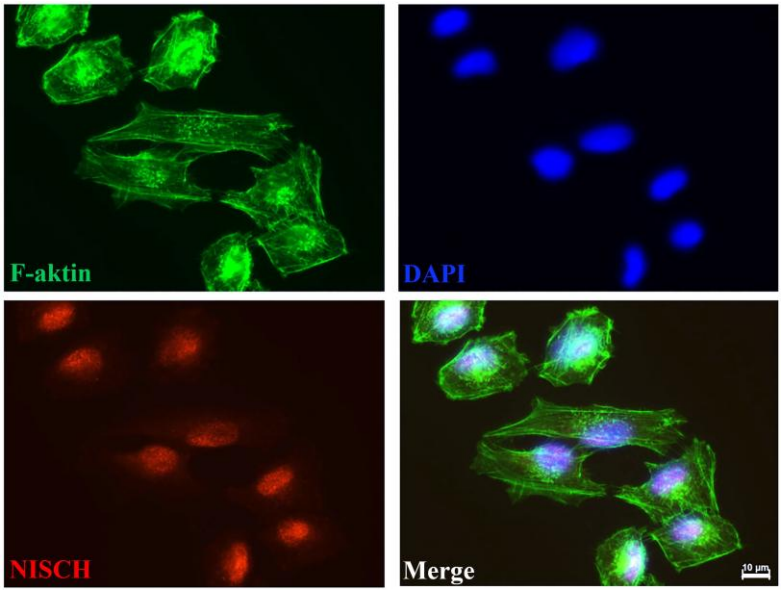


Slika 4.19. Ekspresija NISCH u panelu netumorskih ćelija kože i ćelijskih linija melanoma. (a) Relativna ekspresija *NISCH* iRNK određena qPCR metodom i normalizovana na A375 ćelije, kojima je dodeljena vrednost 1. (b) *Western blot* detekcija NISCH proteina, pri čemu je β-aktin korišćen kao kontrola nanošenja. Denzitometrijske vrednosti su određene u programu *ImageJ* i prikazane relativno u odnosu na A375 ćelije, kojima je dodeljena vrednost 1.

Ekspresija nišarina je potvrđena sa obe metode u svim ispitivanim ćelijskim linijama, sa izuzetkom rezistentne linije A375R. Najniži nivoi nišarina su detektovani u zdravim ćelijama kože, dok je najveća ekspresija i na genskom i proteinskom nivou zabeležena u liniji A375. Sa druge strane, u A375R ćelijama ekspresija NISCH nije detektovana qPCR metodom, dok je WB metodom dobijena bleda traka, što ukazuje da je izrazito smanjena ekspresija nišarina u A375R ćelijama povezana sa razvojem rezistentnog fenotipa ove linije.

4.2.2. Intracelularna lokalizacija NISCH proteina u A375 ćelijama

Intracelularna distribucija nišarina u A375 ćelijama ispitana je primenom fluorescentne mikroskopije, pri čemu je citoskelet vizuelizovan bojenjem F-aktina, dok su ćelijska nukleusi kontrastirana pomoću *DAPI* boje (Slika 4.20).



Slika 4.20. Reprezentativne fluorescentne mikrografije A375 ćelija sa prikazom F-aktina (zeleno), nukleusa obojenih *DAPI* bojom (plavo), NISCH signala (crveno) i preklopljenih kanala (Merge). Skala: 10 µm.

Analizom pojedinačnih i preklopljenih (eng. *merge*) fluorescentnih kanala uočeno je da se signal koji potiče od nišarina (crvena fluorescencija) dominantno javlja u nukleusnom prostoru A375 ćelija. Ovakav obrazac lokalizacije zabeležen je u svih 40 analiziranih ćelija snimljenih u 10 nasumično odabranih vidnih polja (100 %). Dominantna nukleusna lokalizacija potvrđena je kolokalizacijom crvenog i plavog signala u centralnim delovima ćelija. U citoplazmatskom prostoru, čije su granice definisane organizacijom aktinskih filamenata, detektovan je znatno slabiji signal nišarina, što ukazuje na manje prisustvo ovog proteina u tom ćelijskom kompartmentu.

4.2.3. Uticaj agonista I_1-imidazolinskih receptora na ćelijsku vijabilnost u 2D modelu

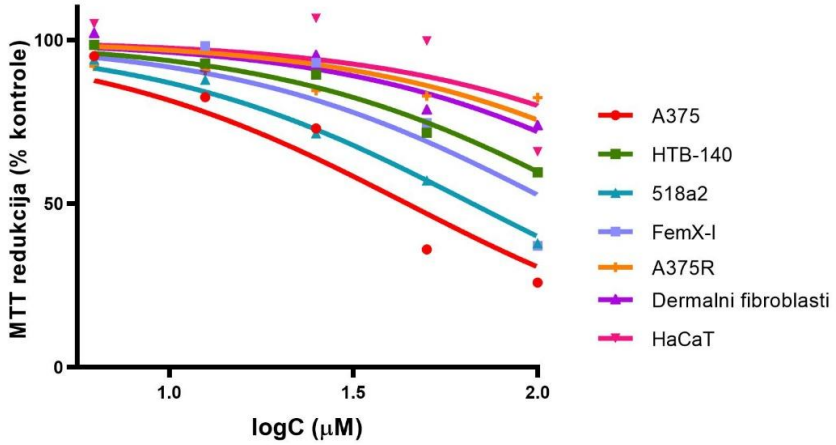
Radi procene antitumorskog potencijala agonista imidazolinskih I_1-receptora, ispitana je metabolička aktivnost ćelija nakon tretmana rilmenidinom, klonidinom i moksonidinom. Sedam adherentnih ćelijskih linija je tretirano ovim lekovima, a MTT redukcija nakon 72 h je kvantifikovana u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrole. Dobijene IC_{50} vrednosti su prikazane u Tabeli 4.3, a koncentraciono zavisne krive za rilmenidin na Slici 4.21.

Tabela 4.3. IC_{50} vrednosti dobijene MTT testom nakon 72 h kontinuiranog tretmana, iz najmanje tri nezavisna eksperimenta urađena u tehničkim triplikatima.

	IC_{50} (95 % CI), µM		
Ćelijska linija	**Rilmenidin**	**Klonidin**	**Moksonidin**
A375	**44.21** (26,78-74,99)	**>200**	**>200**
518a2	**66.51** (56,47-78,72)	**>200**	**>200**
FemX-I	**111.1** (55,32-276,0)	**>200**	**>200**
HTB-140	**148.3** (119,1-188,7)	**>200**	**>200**
A375R	**>200**	**>200**	**>200**
HaCaT (keratinociti)	**>200**	**>200**	**>200**
Dermalni fibroblasti	**>200**	**>200**	**>200**

CI – interval poverenja (eng. *confidence interval*)

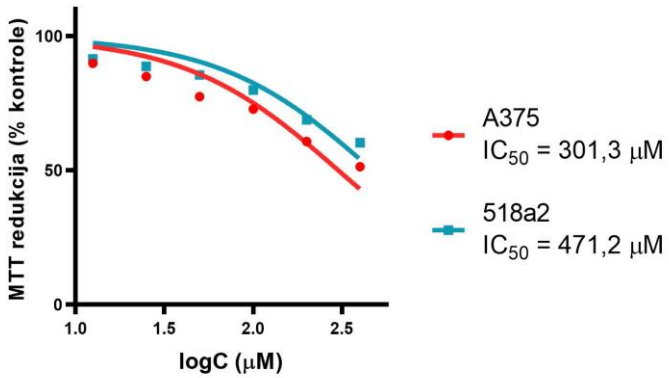
Rezultati MTT testa su pokazali da je rilmenidin najpotentniji od testiranih agonista nišarina, dok su klonidin i moksonidin pokazali slabu aktivnost na svim ćelijskim linijama. Za tretmane kod kojih procenjene IC_{50} vrednosti prelaze 100 μM, odnosno maksimalnu eksperimentalno testiranu koncentraciju, navedene vrednosti predstavljaju procene dobijene ekstrapolacijom nelinearne regresione krive. Najosetljivije linije na rilmenidin su bile A375 (IC_{50} = 44,21 μM) i 518a2 (IC_{50} = 66,51 μM), dok su netumorske linije kože pokazale visoku otpornost na tretmane. Efekti rilmenidina na rezistentnu ćelijsku liniju A375R su takođe bili slabi, što je očekivano s obzirom na izostanak ekspresije nišarina u ovim ćelijama.



Slika 4.21. Koncentraciono zavisna MTT redukcija u panelu ćelijskih linija nakon 72 h tretmana rilmenidinom. Vrednosti su izražene relativno u odnosu na odgovarajuće netretirane kontrole. Koncentracije su logaritamski transformisane, a krive su dobijene nelinearnom regresijom.

4.2.4. Uticaj rilmenidina na ćelijsku vijabilnost i morfologiju sferoida

Nakon što je utvrđeno da rilmenidin ispoljava najpotentnije antitumorsko delovanje među testiranim tretmanima na standardnom 2D modelu, njegova efikasnost je dalje ispitana i na 3D modelu višećelijskih tumorskih sferoida formiranih od A375 i 518a2 ćelija.

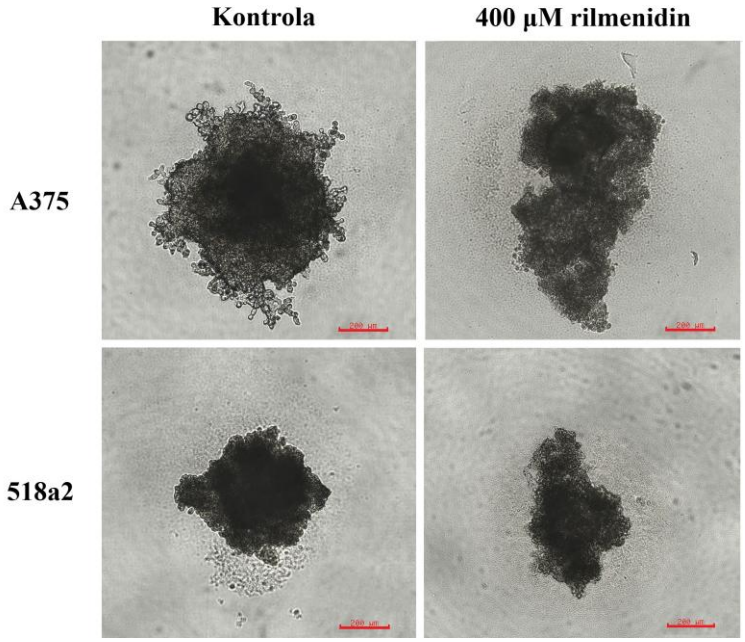


Slika 4.22. Koncentraciono zavisna MTT redukcija u prethodno formiranim A375 i 518a2 sferoidima nakon 72 h kontinuiranog tretmana rilmenidinom. Krive su dobijene nelinearnom regresijom.

Rezultati MTT testa u 3D modelu su pokazali smanjenu osetljivost obe ćelijske linije u odnosu na 2D uslove, pri čemu su IC_{50} vrednosti iznosile 301,3 μM za A375 ćelije (95 % CI: 195,1-485,7

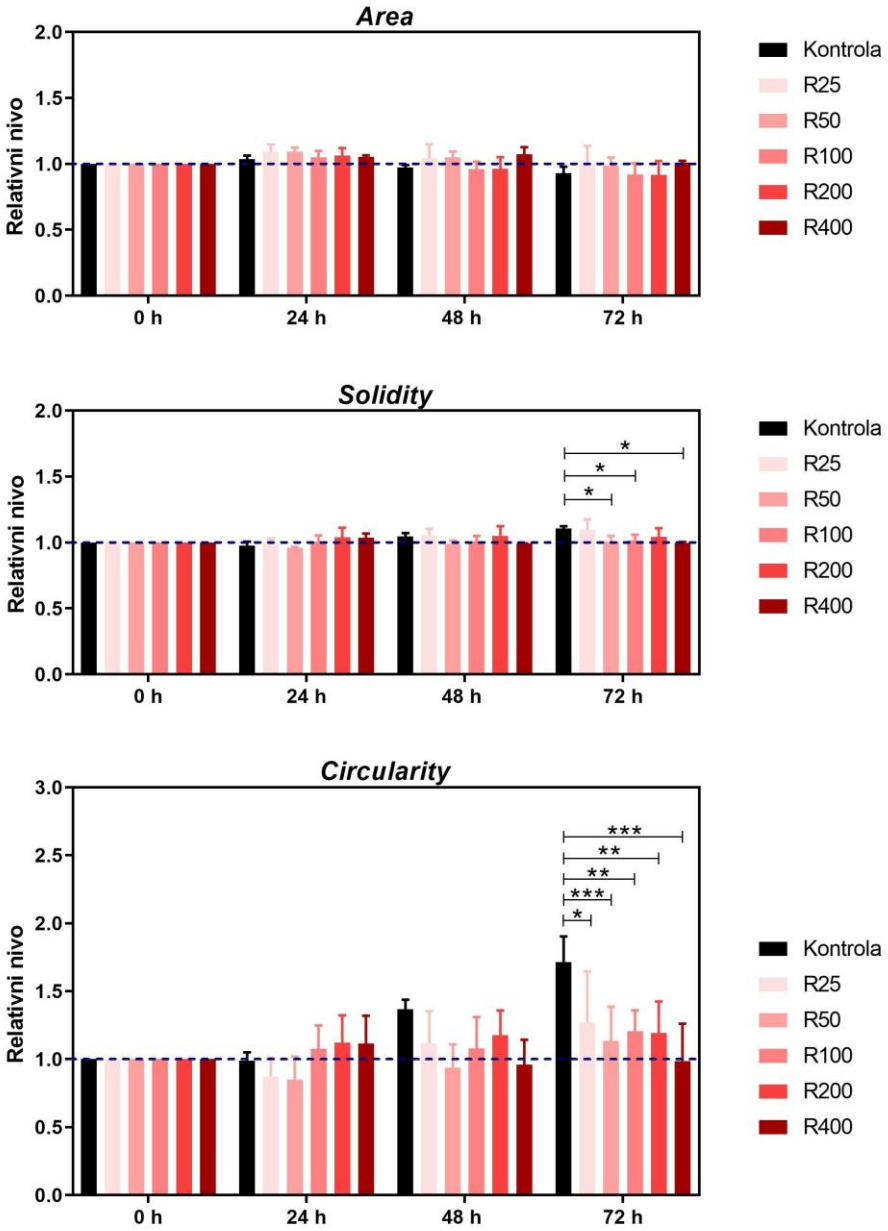
μM) i 471,2 μM za 518a2 ćelije (procenjena vrednost dobijena ekstrapolacijom nelinearne regresione krive, 95 % CI: 325,4-718,0 μM) (Slika 4.22), što odgovara približno sedmostruko višim vrednostima u odnosu na 2D model. Ovakva razlika može biti posledica specifične organizacije ćelija u sferoidima, uključujući ograničenu penetraciju i neravnomernu distribuciju leka kroz trodimenzionalnu strukturu, kao i izmenjene ćelijsko-ćelijske i ćelijsko-matriksne interakcije koje mogu doprineti većoj otpornosti 3D modela na tretman. Takođe je moguće i da se nivo ekspresije NISCH razlikuje između 2D i 3D uslova, što u ovom istraživanju nije ispitivano i biće predmet budućih istraživanja.

Pored procene metaboličke aktivnosti, praćene su i vremenski zavisne promene morfologije A375 i 518a2 sferoida tokom tretmana rilmenidinom. S obzirom na IC_{50} vrednosti dobijene u MTT testu u 3D modelu, u morfološku analizu su uključene koncentracije do 400 μM kako bi se obuhvatio i opseg izraženog odgovora sferoida na tretman. Na reprezentativnim mikrografskim snimcima nakon 72 h uočene su razlike između kontrolnih i sferoida tretiranih rilmenidinom (Slika 4.23). Kontrolni sferoidi obe ćelijske linije imali su relativno kompaktan izgled i jasnije definisanu spoljašnju konturu. Nakon tretmana sa 400 μM rilmenidina uočena je izraženija nepravilnost periferije i promena organizacije sferoida kod obe ćelijske linije.



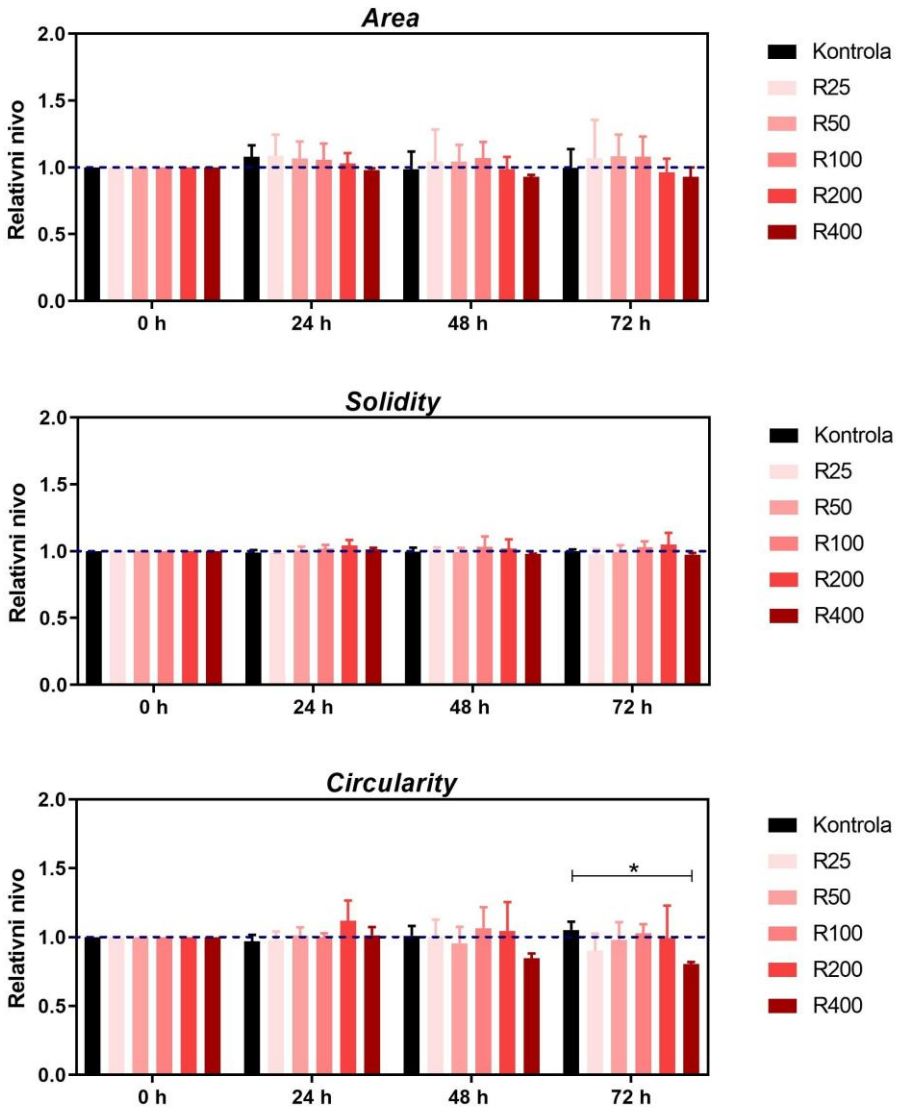
Slika 4.23. Reprezentativni mikrografski snimci prethodno formiranih A375 i 518a2 sferoida nakon 72 h inkubacije u odsustvu tretmana ili u prisustvu 400 μM rilmenidina. Skala: 200 μm.

Za kvantitativnu procenu uočenih morfoloških promena izvršena je morfometrijska analiza sferoida u programu *ImageJ*. Analizirani su projektovana površina (eng. *Area*), *Circularity*, kao pokazatelj pravilnosti oblika i nepravilnosti spoljašnje konture, i *Solidity*, kao pokazatelj morfološke kompaktnosti sferoida (Slike 4.24 i 4.25). U svakom od tri nezavisna eksperimenta analizirana su po tri tehnička ponovka za svaki tretman i vremensku tačku, a iz njihovih vrednosti je izračunat prosek pre finalne statističke analize. Vrednosti na 24, 48 i 72 h su normalizovane na odgovarajuću vrednost na 0 h u istom eksperimentu, kojoj je dodeljena vrednost 1.



Slika 4.24. Morfometrijska analiza A375 sferoida tokom 72 h tretmana rilmenidinom. Oznake R uz broj predstavljaju koncentraciju rilmenidina u µM. Prikazane su relativne vrednosti projektovane površine (*Area*), *Solidity* i *Circularity*, normalizovane na odgovarajuću vrednost u 0 h koja je svedena na 1 (isprekidana linija). U svakom od tri nezavisna eksperimenta analizirana su tri tehnička ponovka, čije su vrednosti prosečene pre statističke analize. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Statistička analiza izvršena je dvofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja tretiranih grupa sa odgovarajućom kontrolom. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Kod A375 sferoida tretman nije doveo do izraženih promena relativne projektovane površine, dok su jasnije promene uočene u parametrima oblika (Slika 4.24). U kontrolnoj grupi vrednosti *Circularity* i *Solidity* su rasle tokom vremena, što ukazuje na postepeno formiranje pravilnije i kompaktnije strukture, dok je ovaj porast bio slabije izražen nakon tretmana rilmenidinom. Nakon 72 h utvrđene su statistički značajne razlike između kontrolne i više tretiranih grupa za oba parametra. Niže vrednosti *Circularity* i *Solidity* ukazuju na nepravilniju konturu i manju morfološku kompaktnost sferoida, što sugeriše da rilmenidin prvenstveno remeti njihovu organizaciju i oblik, bez izraženog smanjenja ukupne projektovane površine.

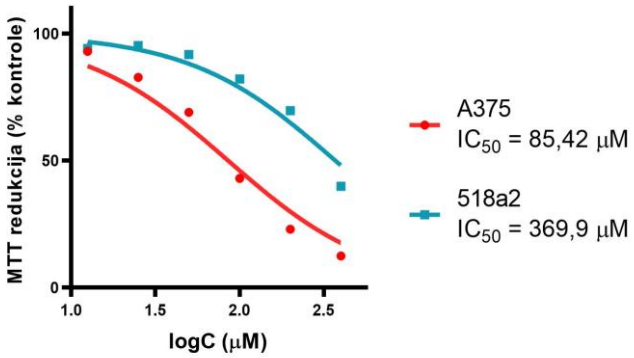


Slika 4.25. Morfometrijska analiza 518a2 sferoida tokom 72 h tretmana rilmenidinom. Prikazane su vrednosti *Area, Solidity* i *Circularity*, izražene relativno u odnosu na odgovarajuću vrednost u 0 h koja je normalizovana na 1 (isprekidana linija). U svakom od tri nezavisna eksperimenta analizirana su tri tehnička ponovka, čije su vrednosti prosečene pre statističke analize. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Statistička analiza izvršena je dvofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja tretiranih grupa sa odgovarajućom kontrolom. * $P < 0,05$.

Kod 518a2 sferoida relativna površina i *Solidity* nisu pokazale izražene promene nakon tretmana, dok je najjasniji efekat uočen za *Circularity* (Slika 4.25). Nakon 72 h najviša koncentracija rilmenidina značajno je smanjila vrednost *Circularity* u odnosu na kontrolu, što ukazuje na izraženiju nepravilnost oblika sferoida. Istovremeno, izostanak promena relativne površine i *Solidity* ukazuje da tretman nije doveo do značajnog smanjenja veličine niti izraženog gubitka morfološke kompaktnosti. Ovi rezultati sugerišu da rilmenidin pri najvišoj koncentraciji prvenstveno narušava pravilnost spoljašnje konture sferoida i u skladu su sa višom IC_{50} vrednošću utvrđenom MTT esejem za ovu ćelijsku liniju, koja ukazuje na njenu manju osetljivost na rilmenidin u odnosu na A375 ćelije.

4.2.5. Inhibicija formiranja sfera u prisustvu rilmenidina

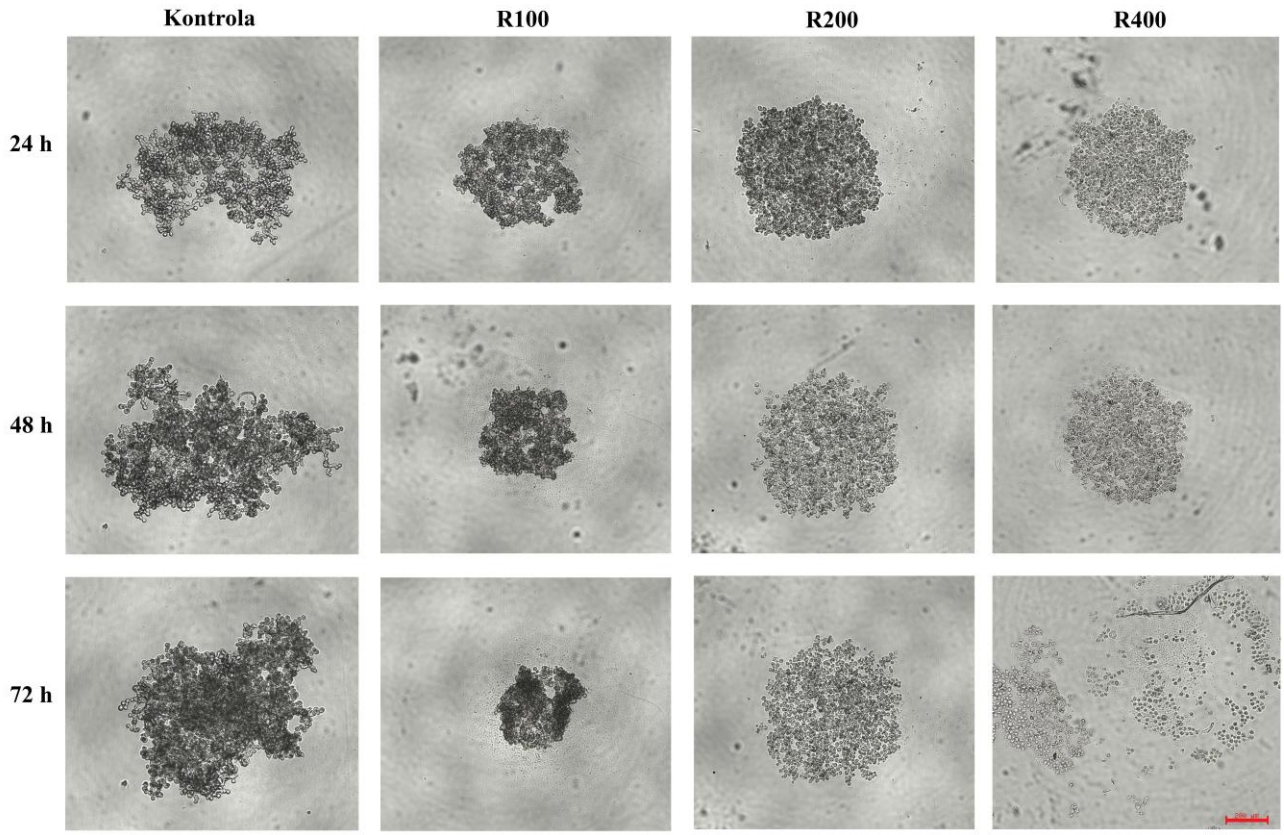
Nakon analize efekta rilmenidina na već formirane trodimenzionalne strukture, ispitan je i njegov uticaj na proces formiranja višećelijskih tumorskih sferoida. U tu svrhu, ćelije linija A375 i 518a2 su zasađene u slabo adherentnim mikrotitarskim pločama sa U dnom u uslovima kotretmana sa rilmenidinom i nakon 72 sata inkubacije, procenjena je razlika u vijabilnosti tretiranih ćelija u odnosu na netretirane kontrole primenom MTT testa.



Slika 4.26. Koncentraciono zavisna MTT redukcija nakon 72 h formiranja A375 i 518a2 sferoida u prisustvu rilmenidina.

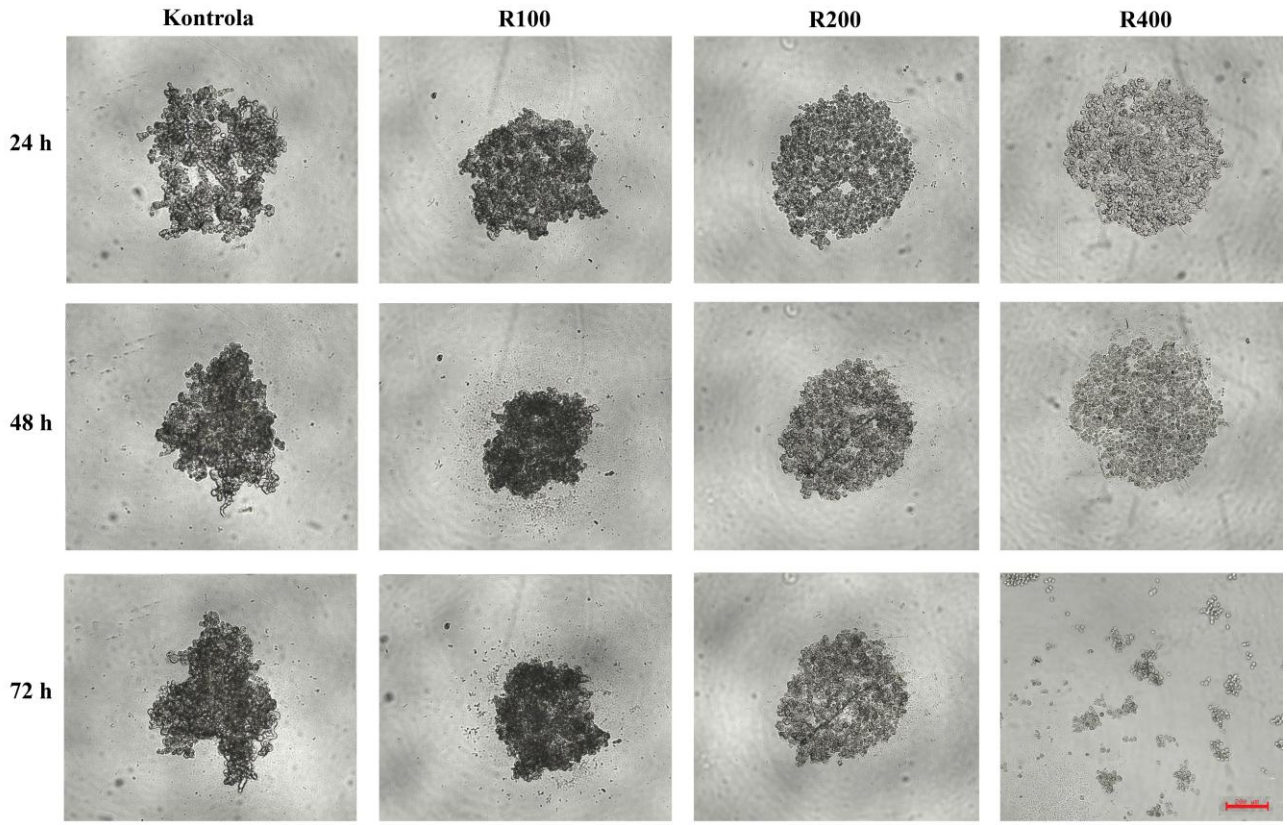
Analiza prelaska sa dvodimenzionalnog na 3D model otkrila je porast rezistencije kod obe ćelijske linije, pri čemu je porast bio znatno izraženiji kod linije 518a2 (Slika 4.26). Kod A375 ćelija, IC_{50} vrednost za inhibiciju formiranja sferoida iznosila je 85,42 µM (95 % CI: 62,72-116,6 µM), što je približno dvostruko više u odnosu na vrednost dobijenu u 2D kulturi. Ovaj efekat bio je još izraženiji kod 518a2 ćelija, kod kojih je IC_{50} u 3D modelu iznosila 369,9 µM (95 % CI: 274,0-512,4 µM), odnosno približno 5,5 puta više nego u odgovarajućem 2D sistemu.

Morfologija nastajućih ćelijskih agregata praćena je nakon 24, 48 i 72 h formiranja u prisustvu rilmenidina (Slike 4.27 i 4.28).



Slika 4.27. Reprezentativni mikrografski snimci A375 ćelijskih agregata formiranih u neadherentnim U bunarima u odsustvu tretmana ili u prisustvu 100, 200 i 400 µM rilmenidina, nakon 24, 48 i 72 h. Skala: 200 µm.

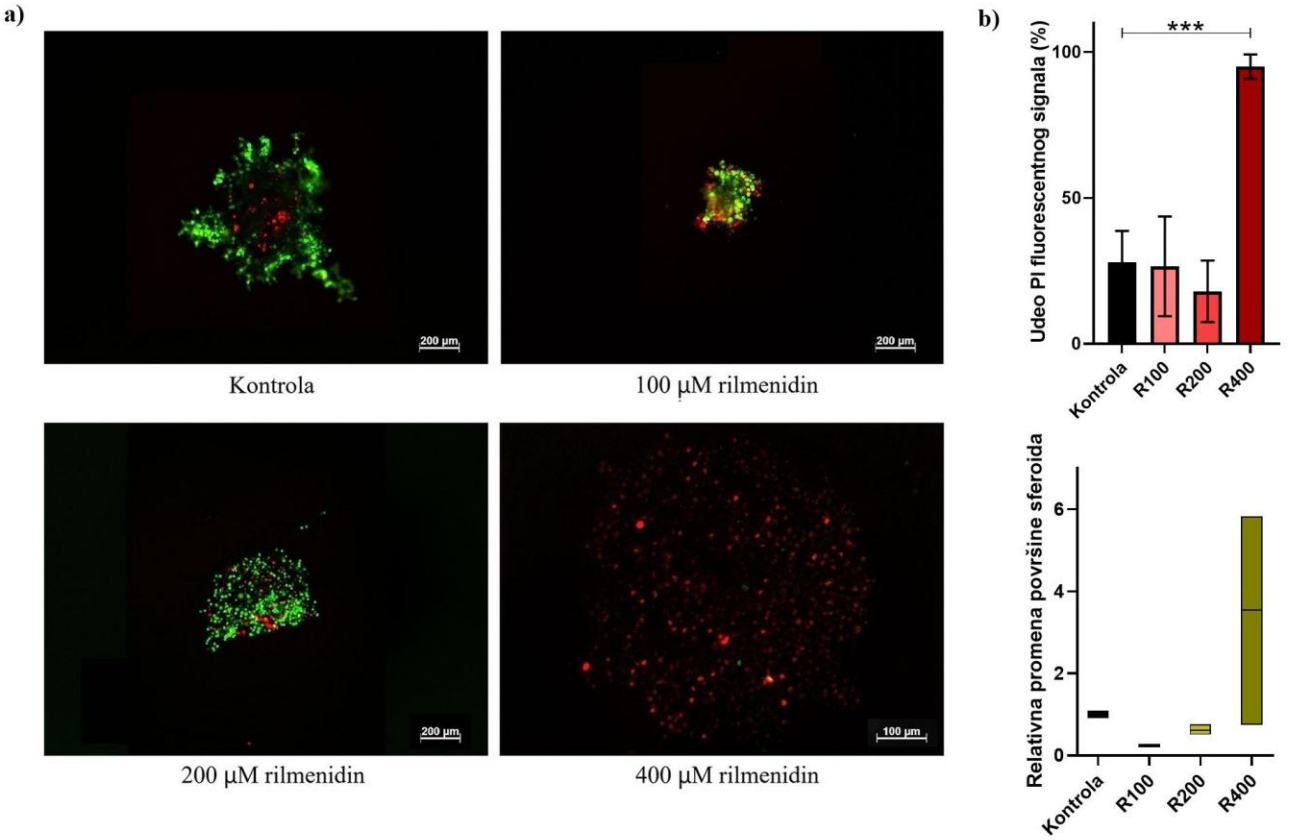
U kontrolnim bunarima A375 ćelije su tokom praćenja formirale centralni agregat koji se vremenom povećavao. Pri 100 µM rilmenidina centralni agregat se održao, ali je bio manji nego u kontroli, dok je pri 200 µM imao vidljivo rastresitiju strukturu. Pri 400 µM centralna grupa bila je uočljiva nakon 24 i 48 h, dok su nakon 72 h ćelije bile rasute, bez jasno formiranog centralnog agregata. Sličan obrazac uočen je u tehničkim i biološkim ponavljanjima: pri nižim koncentracijama ćelije su ostajale okupljene u centralnom agregatu, dok je pri 200 i 400 µM struktura bila rastresitija. Najveća varijabilnost među ponavljanjima uočena je pri 400 µM. U 5 od 8 ukupno analiziranih bunara (62,5 %) ćelije su bile potpuno rasute, kao na Slici 4.27, dok je u preostalim bunarima bila delimično očuvana rastresita centralna grupa. Ovi rezultati ukazuju da rilmenidin, naročito pri višim koncentracijama, narušava organizaciju ćelija tokom formiranja sferoida.



Slika 4.28. Reprezentativni mikrografski snimci 518a2 ćelijskih agregata formiranih u neadherentnim U bunarima u odsustvu tretmana ili u prisustvu 100, 200 i 400 µM rilmenidina, nakon 24, 48 i 72 h. Prikazan je jedan od dva nezavisna eksperimenta. Skala: 200 µm.

Kod 518a2 ćelija se vidi sličan obrazac kao i kod ćelijske linije A375, ali sa nešto blaže izraženim efektima. Centralni agregat je bio očuvan pri 100 µM rilmenidina, dok je pri 200 µM imao rastresitiju organizaciju. Pri tretmanu 400 µM rilmenidinom nakon 72 h na prikazanom snimku nije bio prisutan jedinstven centralni agregat (Slika 4.28), što je bio slučaj u 50 % bunara (4/8).

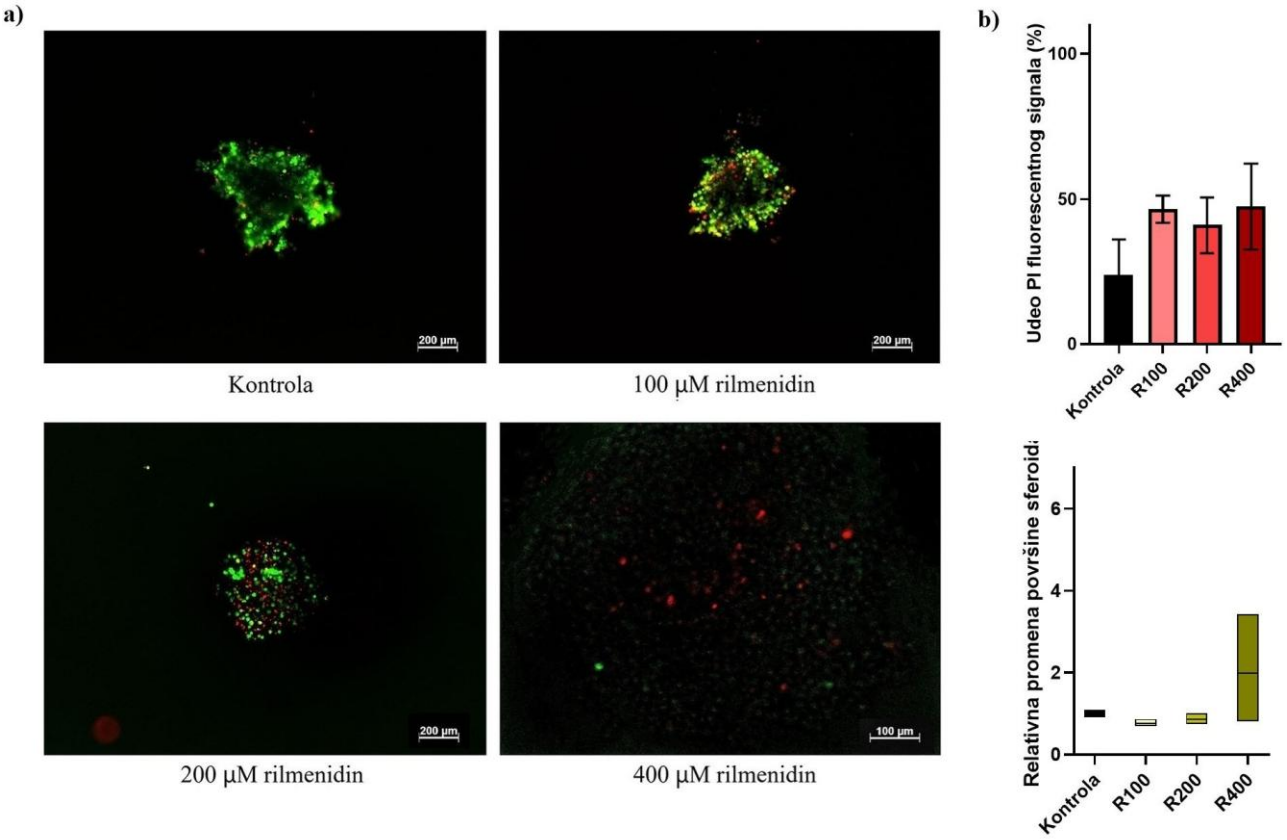
Kako bi se i vizuelno potvrdili efekti tretmana i procenio prostorni raspored živih i mrtvih ćelija unutar sferoida formiranih u prisustvu rilmenidina, primenjeno je dvostruko fluorescentno bojenje kalceinom-AM i propidijum-jodidom (Slike 4.29 i 4.30). Mikroskopska analiza spojenih fluorescentnih signala pokazala je da kontrolni sferoidi obe ćelijske linije emituju intenzivnu zelenu fluorescenciju, što potvrđuje visok udeo metabolički aktivnih i vijabilnih ćelija tokom spontanog formiranja 3D struktura.



Slika 4.29. Kalcein-AM/PI analiza A375 sferoida nakon 72 h formiranja u odsustvu tretmana ili u prisustvu 100, 200 i 400 µM rilmenidina. (a) Reprezentativne fluorescentne mikrografije; kalcein-AM signal prikazan je zeleno, a PI-pozitivne ćelije crveno. Skala: 200 µm za kontrolu, 100 i 200 µM; 100 µm za 400 µM rilmenidin. (b) Udeo PI-pozitivnog fluorescentnog signala i relativna površina sferoida, normalizovana na kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 1. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Statistička analiza izvršena je jednofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja u odnosu na kontrolu. *** $P < 0{,}001$.

Fluorescentna analiza A375 ćelija gajenih u 3D uslovima je pokazala promene u organizaciji ćelijskih agregata i vijabilnosti nakon 72 h tretmana rilmenidinom (Slika 4.29). U kontrolnim uslovima je formirana kompaktna trodimenzionalna struktura sa dominantno zelenom fluorescencijom vijabilnih ćelija na periferiji i signalom crvene fluorescencije u samom centru, koji ukazuje na prisustvo ranog, fiziološki očekivanog nekrotičnog jezgra usled ograničene difuzije kiseonika i nutrijenata u velikim sferoidima. Pri tretmanu 100 µM rilmenidinom uočena je manja i kompaktnija ćelijska struktura, a signal crvene fluorescencije je prisutan širom cele strukture sferoida. Daljim porastom koncentracije na 200 µM formiranje pravilnog sferoida je bilo narušeno, uz rastresitiju centralnu grupu i prisustvo pojedinačnih rasejanih ćelija. Uprkos ovim morfološkim promenama, pri koncentracijama od 100 i 200 µM nije zabeleženo značajno povećanje udela PI fluorescentnog signala u odnosu na kontrolu, koji u sve tri grupe iznosi 20-30 %. Nasuprot tome, pri 400 µM rilmenidina agregacija ćelija je bila slaba ili potpuno onemogućena, uz dominaciju crvene fluorescencije sa udelom PI signala od 97 % u ukupnom fluorescentnom signalu rasutih ćelija. Analiza relativne površine je pokazala smanjenje površine ćelijskih agregata pri tretmanu 100 i 200 µM rilmenidinom u odnosu na kontrolu, ali bez statistički značajnih razlika. Pri 400 µM je zabeležena veća srednja relativna površina što, imajući u vidu odsustvo kompaktne sferoidne strukture, odražava manju ili veću prostornu disperziju pojedinačnih ćelija. Međutim, ni ova razlika nije dostigla

statističku značajnost (P = 0,0994), a izražena varijabilnost ove grupe doprinosi manjoj preciznosti poređenja u primenjenoj analizi.



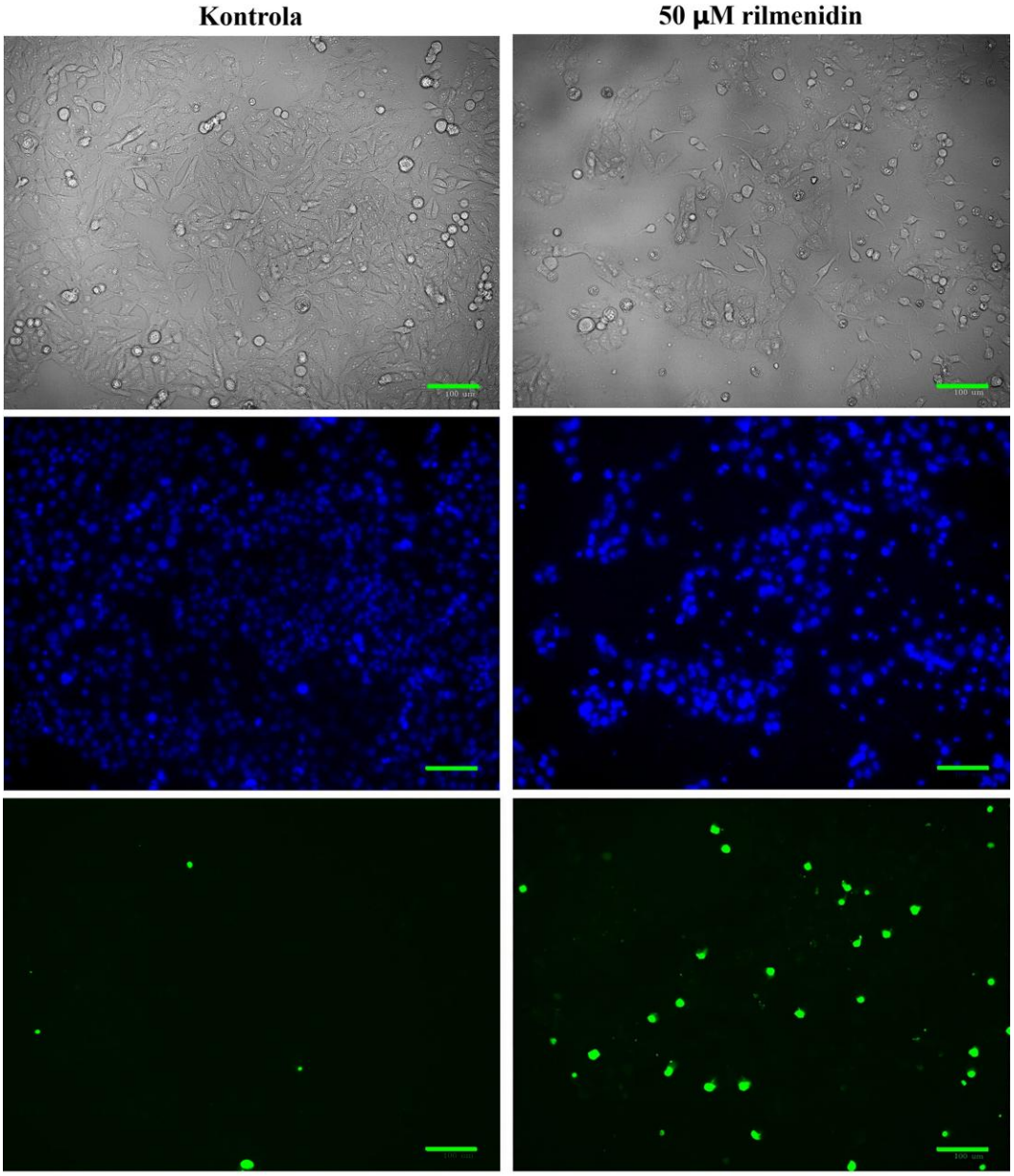
Slika 4.30. Fluorescentno kalcein-AM/PI bojenje višećelijskih tumorskih sferoida linije 518a2 formiranih u uslovima 72 h kotretmana rilmenidinom. (a) Reprezentativne fluorescentne mikrografije; signal kalceina prikazan je zeleno, a PI signal crveno. Skala: 200 µm za kontrolu, 100 i 200 µM; 100 µm za tretman 400 µM rilmenidinom. (b) Udeo PI fluorescentnog signala (%) prikazan kao srednja vrednost ± SD (gornji grafikon) i relativna promena površine sferoida, normalizovana na kontrolu čija je vrednost svedena na 1, prikazana kao kutijasti dijagram (donji grafikon). Statistička analiza izvršena je jednofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja u odnosu na kontrolu, a razlike između tretiranih grupa i kontrole nisu dostigle statističku značajnost.

Fluorescentna analiza 518a2 ćelija nakon 72 h tretmana rilmenidinom je takođe pokazala narušavanje organizacije ćelijskih agregata, uz manje izražene promene vijabilnosti nego kod A375 ćelija (Slika 4.30). U kontrolnim uslovima formirani su kompaktni agregati sa dominantnom zelenom fluorescencijom i ograničenim PI signalom. Pri 100 µM struktura agregata je uglavnom očuvana, dok je pri 200 µM postajala rastresitija. Najveće narušavanje agregacije je uočeno pri 400 µM, kada kompaktna sferoidna struktura više nije bila jasno formirana, iako je deo ćelija zadržavao zelenu fluorescenciju. Kvantitativna analiza pokazala je porast udela PI fluorescentnog signala sa približno 25 % u kontroli na oko 40-50 % u tretiranim grupama, ali bez jasne koncentracijske zavisnosti i bez statistički značajnih razlika. Relativna površina agregata bila je blago smanjena pri 100 i 200 µM, dok je pri 400 µM zabeležena veća srednja vrednost uz izraženu varijabilnost, ali razlika u odnosu na kontrolu nije dostigla statističku značajnost (P = 0,2324). Uočeno povećanje površine je u skladu sa prostornom disperzijom ćelija usled gubitka kompaktne 3D strukture. Očuvanje dela vijabilne populacije i izostanak izraženijeg porasta udela PI fluorescentnog signala pri tretmanu sa 400 µM

rilmenidinom je u skladu sa manjom osetljivošću 518a2 ćelija na rilmenidin u odnosu na A375 ćelije, prethodno utvrđenom MTT testom.

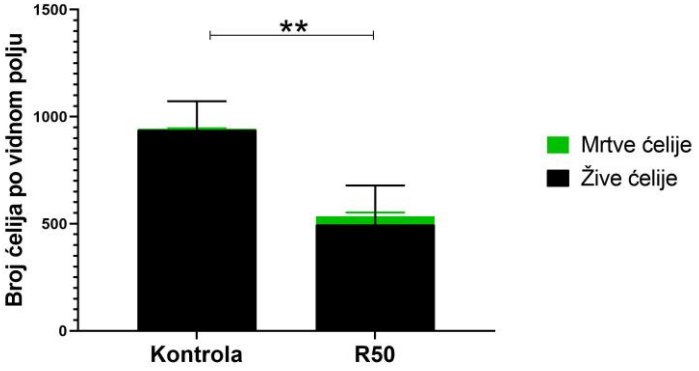
4.2.6. Mikroskopska evaluacija vijabilnosti i morfoloških promena A375 ćelija nakon tretmana rilmenidinom

S obzirom na to da rezultati MTT testa odražavaju metaboličku aktivnost ćelija, a ne direktno njihov broj i vijabilnost, efekti rilmenidina na A375 ćelije u 2D sistemu su dodatno evaluirani mikroskopski u cilju vizuelizacije odnosa živih i mrtvih ćelija, kao i uočavanja potencijalnih morfoloških promena nakon 48 h tretmana sa 50 μM rilmenidinom.



Slika 4.31. Reprezentativni mikrografski snimci A375 ćelija nakon 48 h u kontrolnim uslovima (levo) i nakon tretmana sa 50 μM rilmenidina (desno). Gornji panel prikazuje svetlo polje, srednji *NucBlue Live* signal nukleusa, a donji *NucGreen Dead* signal ćelija sa narušenim integritetom membrane. Skala: 100 μm.

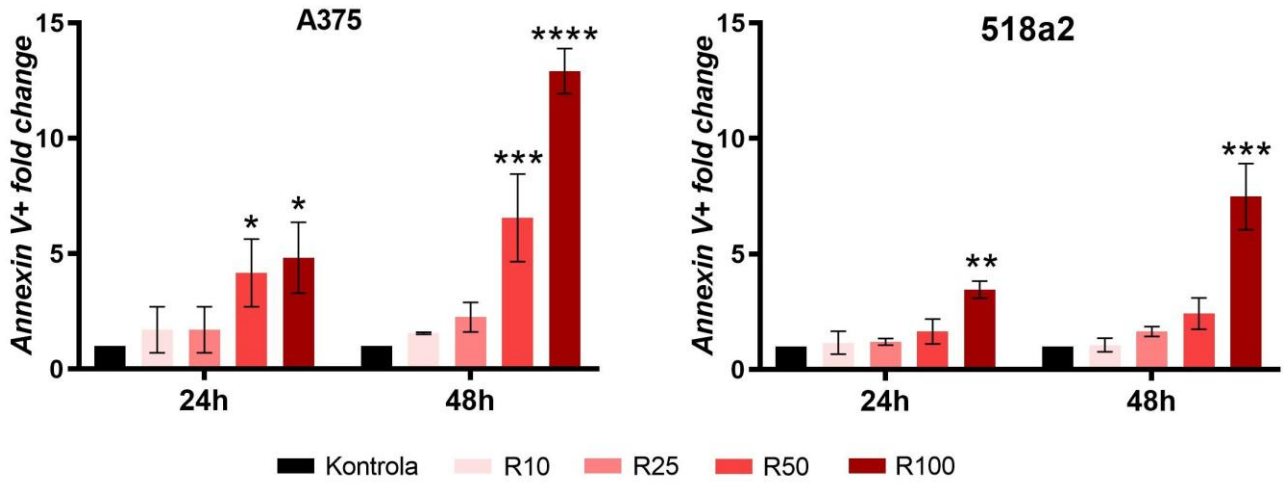
Analiza u svetlom polju i fluorescentna mikroskopija potvrdile su da rilmenidin ispoljava citotoksični efekat na ćelijsku liniju A375 nakon 48 sati inkubacije (Slika 4.31). Na mikrografijama dobijenim u svetlom polju uočava se da kontrolna grupa zadržava visok nivo konfluencije, pri čemu ćelije pokazuju tipičnu adherentnu, poligonalnu i vretenastu morfologiju. Nasuprot tome, tretman rilmenidinom u koncentraciji od 50 μM dovodi do smanjenja gustine ćelijskog monosloja, a prisutan je i gubitak karakteristične morfologije: tretirane ćelije postaju zaobljene i gube kontakt sa podlogom i okolnim ćelijama. Bojenje reagensom *NucBlue Live* (srednji panel) otkrilo je homogeno plavo obojena nukleusi duž celog vidnog polja u kontroli, dok je u tretiranoj grupi gustina plavih signala vidno smanjena, što može ukazivati na smanjenu deobu ćelija pod dejstvom tretmana. Citotoksično delovanje rilmenidina je vidljivo na poslednjem panelu gde su prikazane ćelije obojene *NucGreen Dead* reagensom. Dok su u kontrolnoj grupi detektovane samo sporadične mrtve ćelije, u tretiranim uzorcima je zabeležen statistički značajan porast broja zeleno fluorescentnih signala (Slika 4.32). Ipak, ovde treba napomenuti da je u kontrolnoj grupi udeo mrtvih ćelija bio izuzetno nizak, ispod 1 %, a da je tretman 50 μM rilmenidinom, iako je značajno povećao procenat mrtvih ćelija preko 13 puta, doveo do smrti tek 8 % ukupnog broja ćelija u ovoj vremenskoj tački. Ovi rezultati ukazuju na to da rilmenidin primenjen u koncentraciji od 50 μM tokom 48 h ispoljava umeren citotoksični efekat na A375 ćelije, ali i da verovatno zaustavlja ćelijsku deobu.



Slika 4.32. Ukupan broj A375 ćelija izbrojanih po vidnom polju nakon 48 h u kontrolnoj grupi i nakon tretmana sa 50 μM rilmenidina. Stubovi prikazuju ukupan broj ćelija sa odvojenim udelom živih i mrtvih ćelija. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Statistička značajnost razlike u ukupnom broju ćelija određena je Studentovim *t*-testom. ** $P < 0{,}01$.

4.2.7. Kvantifikacija apoptoze izazvane rilmenidinom

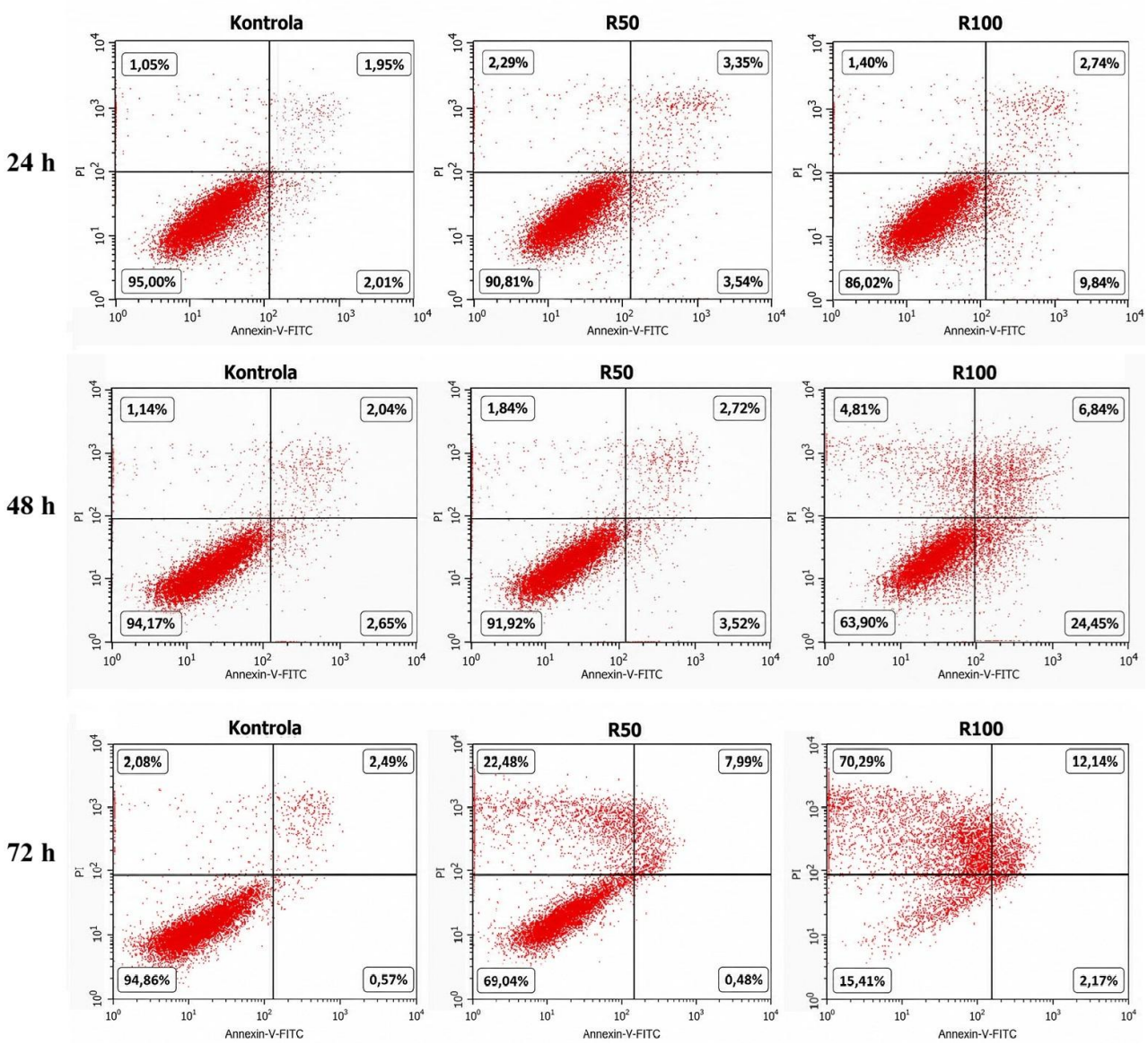
Nakon što je fluorescentnom mikroskopijom potvrđeno da rilmenidin narušava integritet membrana A375 ćelija, rađena je kvantifikacija udela aneksin V-pozitivnih ćelija protočnom citometrijom kako bi se precizno definisao tip ćelijske smrti izazvan nakon 24 h i 48 h tretmana rastućim koncentracijama rilmenidina.



Slika 4.33. Kvantifikacija aneksin V-pozitivnih A375 i 518a2 ćelija nakon 24 i 48 h tretmana rilmenidinom. Prikazan je faktor promene udela aneksin V-pozitivnih ćelija u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, normalizovanu na 1. Podaci su analizirani dvofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

Tretman rilmenidinom je doveo do koncentracijski i vremenski zavisne indukcije apoptoze kod obe ispitivane ćelijske linije, pri čemu je ćelijska linija A375 pokazala veću osetljivost (Slika 4.33). Kod A375 ćelija, značajan porast aneksin V-pozitivnih ćelija je zabeležen već nakon 24 h tretmana višim koncentracijama rilmenidina, 50 i 100 μM (približno 7 % i 10 %, redom). Produžavanjem tretmana na 48 h proapoptotski efekat rilmenidina postao je izraženiji. Pri koncentraciji od 50 μM udeo apoptotičnih ćelija iznosio je približno 14 %, dok je primena 100 μM rilmenidina dovela do njegovog povećanja na približno 30 %. Povećanje udela aneksin V-pozitivnih A375 ćelija nakon 48 h bilo je statistički značajno pri obe koncentracije. Nasuprot tome, niže koncentracije rilmenidina, 10 i 25 μM, nisu značajno uticale na apoptozu ni u jednom od ispitivanih vremenskih intervala.

U ćelijskoj liniji 518a2 značajna indukcija apoptoze je zabeležena samo pri primeni najviše ispitivane koncentracije rilmenidina. Tretman koncentracijom od 100 μM doveo je do statistički značajnog povećanja udela aneksin V-pozitivnih ćelija već nakon 24 h, kada je udeo apoptotičnih ćelija iznosio približno 7 %. Produžavanjem tretmana na 48 h ovaj efekat je postao izraženiji i udeo apoptotičnih ćelija je dostigao približno 19 %, što ukazuje na vremenski zavisno pojačavanje proapoptotskog efekta rilmenidina pri koncentraciji od 100 μM. Nasuprot tome, koncentracije od 10, 25 i 50 μM nisu dovele do statistički značajnih promena udela aneksin V-pozitivnih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom ni u jednoj od ispitivanih vremenskih tačaka.



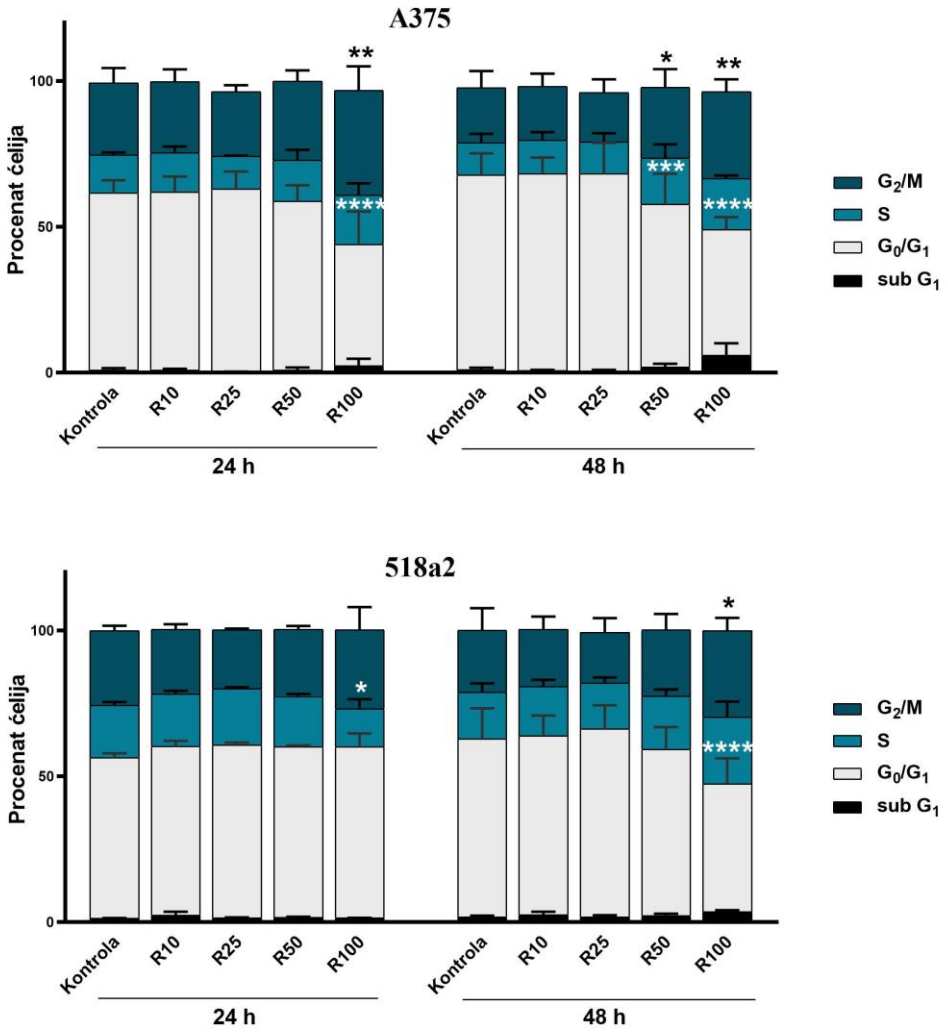
Slika 4.34. Reprezentativni aneksin V/PI dot-plotovi A375 ćelija nakon 24, 48 i 72 h tretmana rilmenidinom. Donji levi kvadrant prikazuje aneksin V^-/PI^- ćelije, donji desni aneksin V^+/PI^-, gornji desni aneksin V^+/PI^+, a gornji levi aneksin V^-/PI^+ populaciju. Brojevi u kvadrantima predstavljaju procenat ćelija unutar analiziranog gejta. Eksperimenti nakon 24 i 48 h su izvedeni u najmanje tri nezavisna biološka ponavljanja i korišćeni za kvantitativnu analizu, dok je analiza nakon 72 h izvedena jednom i nije uključena u statističku analizu.

Detaljnija analiza raspodele A375 ćelija prema aneksin V/PI bojenju potvrdila je promenu obrasca ćelijske smrti sa produžavanjem tretmana (Slika 4.34). Nakon 24 i 48 h uočeno je postepeno smanjenje vijabilne aneksin V^-/PI^- populacije uz porast aneksin V-pozitivnih ćelija, naročito pri višim koncentracijama rilmenidina, u skladu sa prethodno prikazanom kvantifikacijom apoptoze. U pojedinačnom eksperimentu nakon 72 h zabeležena je drugačija raspodela populacija, sa izraženim porastom aneksin V^-/PI^+ frakcije, posebno pri 100 μM rilmenidina, kada je udeo vijabilnih ćelija iznosio 15,41 %. Ovakav raspored populacija ukazuje da je u kasnoj vremenskoj tački gubitak vijabilnosti bio praćen prvenstveno povećanjem PI-pozitivne, aneksin V-negativne frakcije, odnosno fenotipom koji se primenom ovog testa klasifikuje kao nekrotična ćelijska smrt. Ipak, treba imati u vidu da aneksin V/PI test ne omogućava razlikovanje različitih oblika regulisane ćelijske smrti. Više savremeno definisanih tipova smrti, uključujući nekroptozu, piroptozu i feroptozu, nakon gubitka

integriteta membrane mogu se u ovoj analizi ispoljiti kao PI-pozitivna, fenotipski nekrotična populacija.

4.2.8. Uticaj rilmenidina na raspodelu ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Za ispitivanje uticaja rilmenidina na progresiju ćelijskog ciklusa u linijama melanoma, sprovedena je analiza protočnom citometrijom. Dobijeni rezultati ukazuju da efekti rilmenidina zavise od koncentracije i dužine tretmana, kao i od ispitivane ćelijske linije (Slika 4.35).



Slika 4.35. Raspodela A375 (a) i 518a2 (b) ćelija u fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 i 48 h tretmana različitim koncentracijama rilmenidina. Podaci su prikazani kao srednja vrednost procenta ćelija ± SD. Statistička analiza izvršena je dvofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja sa odgovarajućom kontrolom u svakoj vremenskoj tački. Bele zvezdice unutar stubića označavaju značajnost promena u G_0/G_1 i S fazi, a tamne zvezdice iznad stubića promene u G_2/M fazi. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

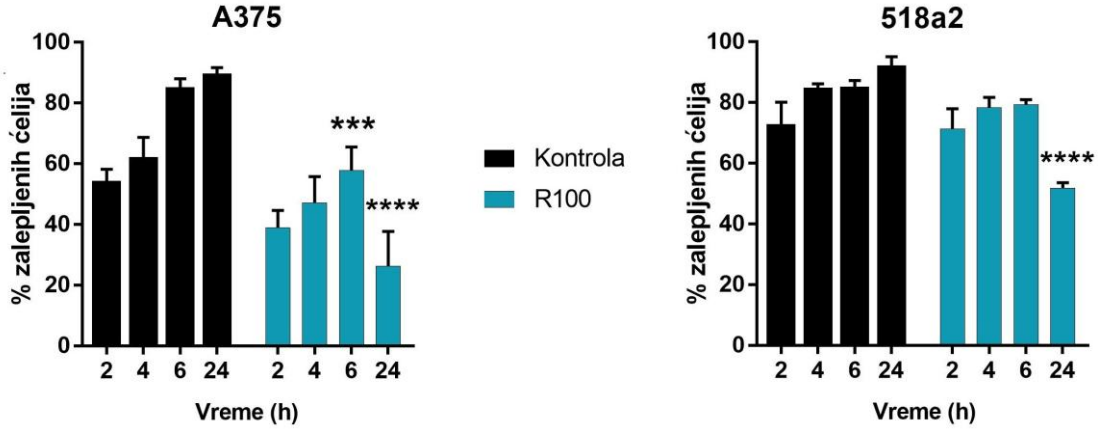
U A375 ćelijama nakon 24 h pri 100 μM rilmenidina utvrđeno je statistički značajno smanjenje udela ćelija u G_0/G_1 fazi i povećanje G_2/M populacije. Nakon 48 h isti obrazac bio je prisutan pri 50 i 100 μM, sa izraženijom promenom pri 100 μM (Slika 4.35a). U 518a2 ćelijama

nakon 24 h pri 100 µM rilmenidina zabeleženo je statistički značajno smanjenje udela ćelija u S fazi. Nakon 48 h pri 100 µM utvrđeno je smanjenje G_0/G_1 i povećanje G_2/M populacije, dok pri 10, 25 i 50 µM nisu zabeležene statistički značajne promene (Slika 4.35b).

Udeo ćelija u sub-G_1 populaciji ostao je relativno nizak kod obe ćelijske linije u svim ispitivanim vremenskim tačkama, bez statistički značajnih odstupanja u odnosu na kontrolu, ali sa blagim povećanjem na najvišim koncentracijama tretmana. Ovaj nalaz je posebno značajan imajući u vidu relativno kratko vreme udvostručavanja ispitivanih melanomskih ćelija. Tokom 48 h kontrolne populacije obe testirane ćelijske linije mogu proći kroz više ciklusa populacionog udvostručavanja, što ukazuje da odsustvo izraženog porasta sub-G_1 frakcije nije posledica nedovoljnog trajanja eksperimenta da bi ćelije prošle kroz ćelijski ciklus. Umesto toga, rezultati ukazuju da dominantna promena detektovana analizom sadržaja DNK nije bila akumulacija hipodiploidnih ćelija, već preraspodela populacije kroz faze ćelijskog ciklusa, pre svega ka G_2/M fazi.

4.2.9. Promene u ćelijskoj adheziji pod dejstvom tretmana

Kako bi se ispitao uticaj rilmenidina na adhezivna svojstva ćelija A375 i 518a2, analizirani su njegovi efekti na početno vezivanje ćelija iz suspenzije za podlogu, kao i na održavanje adhezije već zalepljenih ćelija. U prvom eksperimentu praćen je procenat adherentnih ćelija tokom 24 h nakon zasejavanja u prisustvu ili odsustvu 100 µM rilmenidina. U drugom eksperimentu prethodno adherentne ćelije su tretirane istom koncentracijom rilmenidina, nakon čega je tokom 24 časa praćena promena udela ćelija koje su ostale vezane za podlogu.

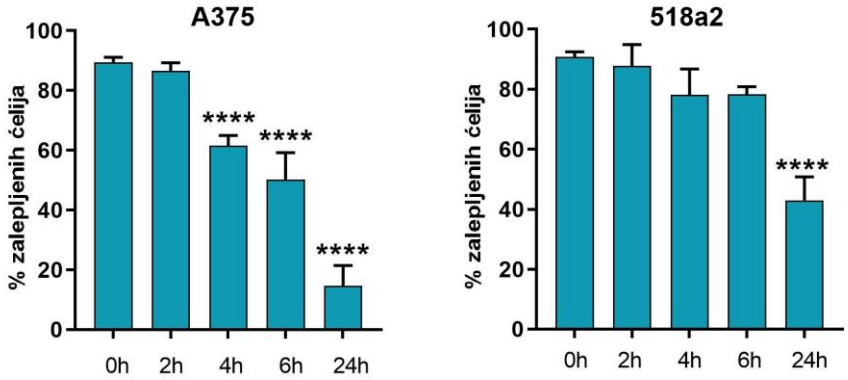


Slika 4.36. Adhezija A375 i 518a2 ćelija zasejanih u prisustvu ili odsustvu 100 µM rilmenidina (R100). Procenat adherentnih ćelija određen je nakon 2, 4, 6 i 24 h. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Statistička analiza izvršena je dvofaktorskom analizom varijanse sa Šidakovim testom za višestruka poređenja tretirane i odgovarajuće kontrolne grupe u istoj vremenskoj tački. *** $P <$ 0,001, **** $P <$ 0,0001.

Tretman sa 100 µM rilmenidina smanjio je adheziju A375 ćelija u svim analiziranim vremenskim tačkama, ali je statistički značajna razlika u odnosu na odgovarajuću kontrolu utvrđena nakon 6 časova, a bila je najizraženija nakon 24 h kada je procenat adheriranih A375 ćelija u tretiranoj grupi iznosio približno 25 %, naspram približno 90 % u kontrolnoj grupi (Slika 4.36). Kod 518a2 ćelija rilmenidin nije značajno uticao na adheziju tokom prvih 6 časova. Međutim, nakon 24 h je zabeleženo izraženo smanjenje procenta adherentnih ćelija u tretiranoj grupi, sa oko 90 % u kontroli na oko 50 % nakon tretmana. Nakon poslednjeg snimanja sve ćelije iz bunara (i adherentne i odvojene

ćelije) su sakupljene, a njihov broj i vijabilnost određeni su testom bojenja tripan-plavim. Kod A375 ćelija, udeo vijabilnih ćelija nakon 24 časa je iznosio prosečno oko 96 % u kontrolnoj grupi i 71 % u grupi tretiranoj sa 100 μM rilmenidina. Kod 518a2 ćelija, vijabilnost je iznosila prosečno oko 95 % u kontroli i 78,3 % nakon tretmana rilmenidinom. Iako je tretman smanjio ukupnu vijabilnost, većina ćelija u tretiranim grupama ostala je živa, što sugeriše da smanjenje broja adherentnih ćelija nije bilo isključivo posledica ćelijske smrti, već narušavanja njihove sposobnosti vezivanja za podlogu, koja u kasnijim vremenskim tačkama može dovesti do indukcije ćelijske smrti. Efekat je bio izraženiji i ranije uočljiv kod A375 nego kod 518a2 ćelija. Imajući u vidu da je u prethodnoj analizi ekspresija nišarina bila znatno niža u 518a2 nego u A375 ćelijama, ova razlika može ukazivati na povezanost jačine odgovora na rilmenidin sa nivoom NISCH.

Nakon toga je ispitan i uticaj 100 μM rilmenidina na adheziju već zalepljenih ćelija, a procenat adherentnih ćelija praćen je u istim vremenskim tačkama tokom 24 h. Rilmenidin je doveo do vremenski zavisnog smanjenja udela zalepljenih ćelija u obe ispitivane ćelijske linije, pri čemu je efekat bio raniji i izraženiji u A375 ćelijama (Slika 4.37). Već nakon 4 h, udeo adherentnih A375 ćelija se značajno smanjio, na približno 60 %, dok je nakon 6 h iznosio oko 50 % u odnosu na ukupan broj ćelija. Najizraženiji efekat zabeležen je nakon 24 časa, kada je samo oko 15 % ćelija bilo zalepljeno. Smanjenje udela adherentnih 518a2 ćelija tokom prvih šest časova bilo je postepenije i nije dostiglo statističku značajnost. Nakon 24 h tretmana, procenat zalepljenih ćelija smanjen je na približno 40 %. Dobijeni rezultati pokazuju da rilmenidin podstiče odlepljivanje ćelija melanoma koje je vremenski zavisno.



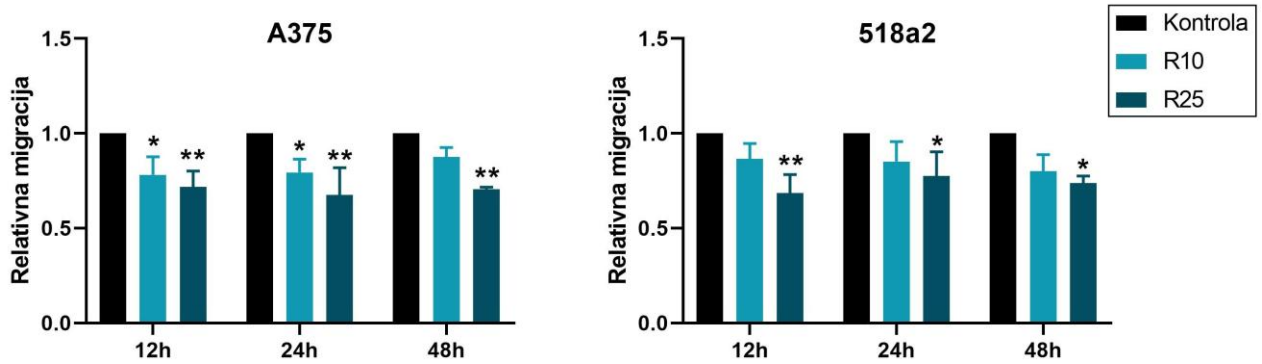
Slika 4.37. Udeo adherentnih A375 i 518a2 ćelija nakon tretmana prethodno zalepljenih ćelija sa 100 μM rilmenidina. U svakoj vremenskoj tački prebrojane su adherentne i odvojene ćelije, a rezultati su izraženi kao procenat adherentnih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± SD. Statistička analiza izvršena je jednofaktorskom analizom varijanse sa Danetovim testom za višestruka poređenja u odnosu na 0 h. **** $P < 0{,}0001$.

Vijabilnost odlepljenih ćelija nakon 24 h tretmana određena je testom isključenja tripan-plavog. Preko 80 % odlepljenih ćelija bilo je vijabilno pri svakom izvođenju eksperimenta, što potvrđuje da je smanjenje udela adherentnih ćelija pretežno posledica gubitka adhezije i odlepljivanja od podloge, a ne ćelijske smrti. Pri tumačenju rezultata treba uzeti u obzir da su ploče tokom eksperimenata više puta vađene iz inkubatora radi snimanja u različitim vremenskim tačkama.

4.2.10. Uticaj rilmenidina na migratorni potencijal ćelija

Uticaj rilmenidina na migratorni potencijal A375 i 518a2 ćelija je ispitan testom zatvaranja rane tokom 12, 24 i 48 h. Stepen zatvaranja rane je izražen relativno u odnosu na odgovarajuću kontrolu, čija je vrednost u svakoj vremenskoj tački normalizovana na 1 (Slika 4.38).

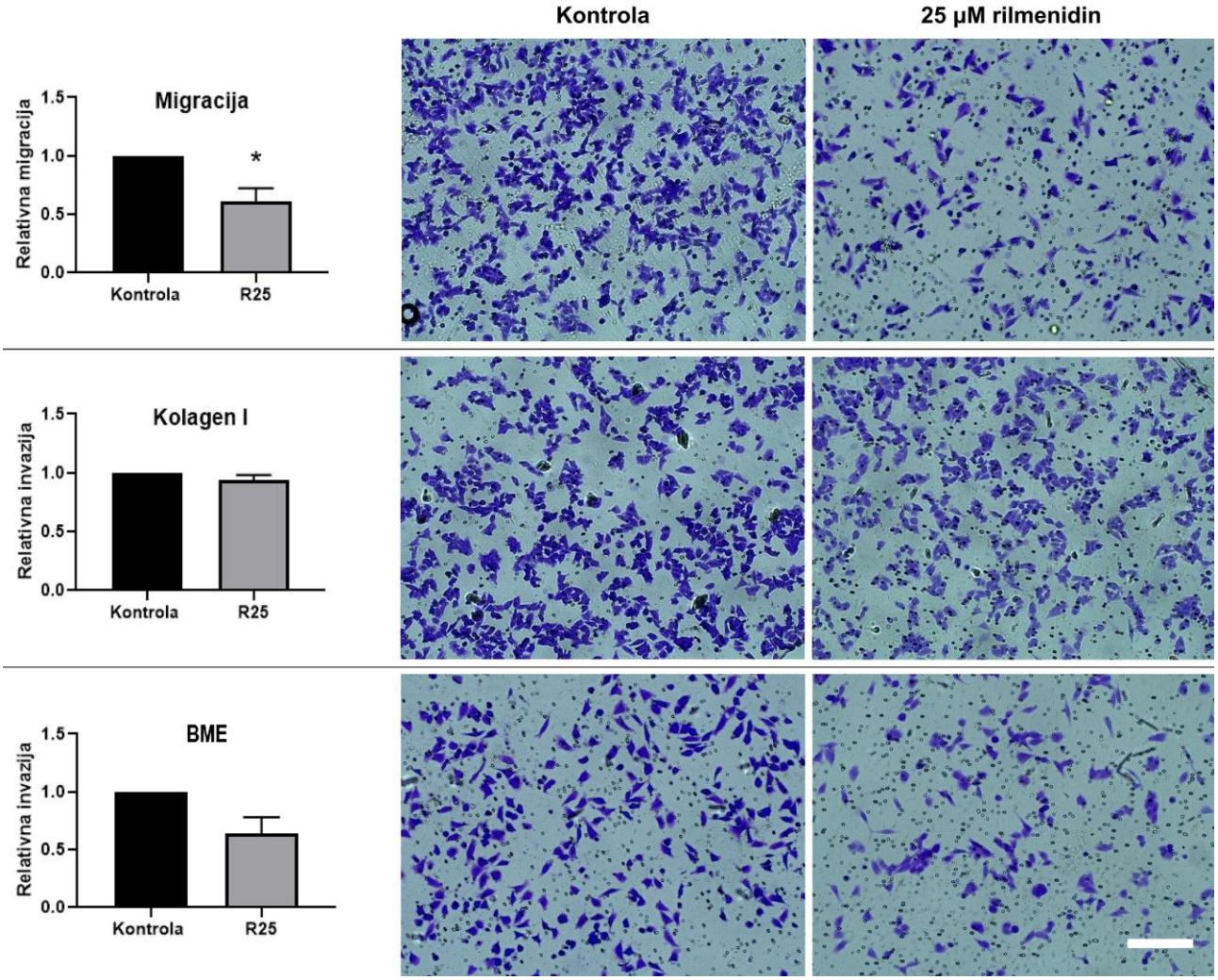
Kod A375 ćelija, obe ispitivane koncentracije rilmenidina su značajno smanjile zatvaranje rane nakon 12 h, pri čemu je efekat bio izraženiji pri koncentraciji od 25 µM nego pri 10 µM. Sličan efekat zabeležen je nakon 24 sata, kada su koncentracije od 10 i 25 µM takođe značajno smanjile relativni nivo zatvaranja rane. Nakon 48 h, statistički značajno smanjenje zadržano je samo pri koncentraciji od 25 µM, dok promena pri koncentraciji od 10 µM nije bila statistički značajna. Kod 518a2 ćelija, tretman rilmenidinom u koncentraciji od 10 µM nije doveo do statistički značajne promene zatvaranja rane ni u jednoj analiziranoj vremenskoj tački. Nasuprot tome, koncentracija od 25 µM značajno je smanjila zatvaranje rane u svim vremenskim tačkama, pri čemu je najizraženija razlika u odnosu na kontrolu bila nakon 12 sati tretmana.



Slika 4.38. Relativni nivo zatvaranja rane u kulturama A375 i 518a2 ćelija tretiranim sa 10 i 25 µM rilmenidinom. Vrednosti su izražene relativno u odnosu na odgovarajuću kontrolu, normalizovanu na 1 u svakoj vremenskoj tački. Stubovi predstavljaju srednju vrednost ± SD. Statistička analiza je izvršena dvofaktorskom analizom varijanse praćenom Danetovim testom za višestruka poređenja tretiranih grupa sa odgovarajućom kontrolom. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.2.11. Promene u sposobnosti kretanja tretiranih ćelija kroz transwell inserte

Kako bi se ispitao uticaj rilmenidina na kretanje A375 ćelija i njihovu sposobnost probijanja kroz ekstracelularni matriks, izvedeni su *transwell* eseji migracije kroz prazne inserte i invazije kroz inserte obložene barijerom od kolagena tipa I i BME (Slika 4.39).



Slika 4.39. Bazalna migracija i invazija A375 ćelija kroz kolagen tipa I i BME u *transwell* eseju nakon 16 h u odsustvu ili prisustvu 25 μM rilmenidina. Na levim panelima je prikazana kvantifikacija, izražena kao relativna promena u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu, čija je vrednost normalizovana na 1. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu izračunat je primenom Studentovog *t*-testa, * $P < 0,05$. Na desnim panelima su prikazani reprezentativni mikrografski snimci A375 ćelija koje su migrirale kroz neobloženu membranu, odnosno izvršile invaziju kroz membranu obloženu kolagenom tipa I ili BME. Merna skala: 200 μm.

Tretman sa 25 μM rilmenidina doveo je do inhibicije bazične pokretljivosti A375 ćelija i smanjio hemotaktičku migraciju za približno 40 % u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, rilmenidin nije statistički značajno uticao na invaziju kroz matricu kolagena tipa I, pri čemu je relativni broj ćelija koje su prošle kroz kolagensku barijeru iznosio približno 94 % kontrolne vrednosti. Izraženiji trend smanjenja invazivnosti uočen je u eseju sa BME, gde je broj ćelija koje su prošle kroz matricu nakon tretmana iznosio prosečno 64 % kontrolne vrednosti, ali razlika nije dostigla statističku značajnost ($P = 0,0692$; $n = 3$). Ovi rezultati ukazuju da je antimigratorni efekat rilmenidina izraženiji od njegovog efekta na sposobnost A375 ćelija da prolaze kroz ekstracelularni matriks.

Kako bi se procenilo u kojoj meri uočene promene u prolasku ćelija kroz ekstracelularni matriks odražavaju promene njihove bazične pokretljivosti, izračunat je indeks invazivnosti. Indeks invazivnosti kroz BME koji je iznosio približno 1 (1,05) ukazuje na to da je smanjenje broja ćelija koje prolaze kroz ovaj supstrat bilo proporcionalno smanjenju njihove bazalne migracije. Ovakav nalaz sugeriše da tretman rilmenidinom nije dodatno smanjio sposobnost ćelija da prolaze kroz BME

u odnosu na efekat koji je već ostvaren na njihovu opštu pokretljivost. Nasuprot tome, indeks invazivnosti kroz kolagen tipa I je iznosi 1,58, što ukazuje da je sposobnost prolaska kroz kolagensku matricu bila relativno očuvana u odnosu na izraženo smanjenje bazalne migracije. Takav rezultat sugeriše da rilmenidin različito utiče na migratornu komponentu i sposobnost ćelija da prolaze kroz trodimenzionalnu kolagensku barijeru. Razlika između dva matriksa može ukazivati na matriks-specifičan odgovor ćelija na rilmenidin. BME predstavlja model bazalne membrane i sadrži prvenstveno laminin, kolagen tipa IV i druge komponente bazalne membrane, dok fibrilarni kolagen tipa I predstavlja drugačiju fizičku i biohemijsku barijeru, čije savladavanje uključuje specifične adhezivne, mehanosenzitivne i proteolitičke mehanizme (Wolf & Friedl, 2011). Dobijeni rezultati stoga ukazuju da efekat rilmenidina na invazivno ponašanje ćelija može zavisiti i od karakteristika ekstracelularne barijere kroz koju ćelije prolaze.

4.2.12. Uticaj rilmenidina na vremenski zavisne promene obogaćenosti genskih skupova

Kako bi se stekao detaljniji uvid u mehanizam dejstva rilmenidina, urađeno je sekvenciranje transkriptoma ćelija melanoma koje su tretirane 25 μM rilmenidinom, kao i odgovarajuće netretirane kontrole. Transkripcioni odgovor A375 ćelija na tretman je analiziran metodom GSEA, korišćenjem *Hallmark* (Tabela 4.4) i *Reactome* (Tabela 4.5) kolekcija genskih skupova. Analize su sprovedene odvojeno nakon 24 i 48 h tretmana. Pozitivan normalizovani skor obogaćenosti označavao je obogaćenost genskog skupa među genima sa povećanom ekspresijom nakon tretmana, dok je negativan NES označavao obogaćenost među genima sa smanjenom ekspresijom. Kao značajni izdvojeni su genski skupovi sa nominalnim $P < 0,05$ i FDR $q < 0,05$.

Tabela 4.4. Odabrani *Hallmark* genski skupovi sa promenjenim obrascem obogaćenosti u A375 ćelijama nakon 24 i 48 h tretmana rilmenidinom

	24 h		**48 h**	
Genski skup	**NES**	**FDR q**	**NES**	**FDR q**
G2M Checkpoint	**2,934**	**<0,001**	**−2,286**	**0,0036**
E2F Targets	**2,550**	**<0,001**	**−2,809**	**<0,001**
Mitotic Spindle	**2,597**	**<0,001**	−1,529	0,1099
mTORC1 Signaling	**1,996**	**0,0146**	**−2,208**	**0,0042**
PI3K AKT mTOR Signaling	**1,801**	**0,0367**	−1,301	0,2016
Oxidative Phosphorylation	**−3,179**	**<0,001**	**−2,496**	**<0,001**
Fatty Acid Metabolism	**−1,968**	**0,0222**	**−2,215**	**0,0043**
MYC Targets V1	**−2,578**	**<0,001**	**−3,580**	**<0,001**
Epithelial Mesenchymal Transition	**−1,865**	**0,0243**	−1,509	0,1136
Apical Junction	−1,051	0,4406	**2,091**	**0,0159**
P53 Pathway	**−2,568**	**<0,001**	**2,556**	**0,0011**

Podebljane NES i FDR q vrednosti označavaju statistički značajna obogaćenja genskih skupova, za koje su $P < 0,05$ i FDR $q < 0,05$.

Tabela 4.5. Odabrani *Reactome* genski skupovi sa promenjenim obrascem obogaćenosti u A375 ćelijama nakon 24 i 48 h tretmana rilmenidinom

	24 h		**48 h**	
Genski skup	**NES**	**FDR q**	**NES**	**FDR q**
Cell Cycle, Mitotic	**3,740**	**<0,001**	**−2,812**	**<0,001**
M Phase	**3,046**	**<0,001**	**−2,411**	**0,0084**
Cell Cycle Checkpoints	**3,014**	**<0,001**	**−3,283**	**<0,001**
G2/M DNA Damage Checkpoint	**2,898**	**<0,001**	**−2,954**	**<0,001**
G2/M Checkpoints	**2,360**	**0,0115**	**−2,786**	**<0,001**
Mitotic Spindle Checkpoint	**2,287**	**0,0149**	**−2,257**	**0,0173**
Rho GTPase Cycle	**2,702**	**0,0029**	−1,886	0,0910
Translation	**−3,280**	**<0,001**	**−3,514**	**<0,001**
Eukaryotic Translation Initiation	**−3,484**	**<0,001**	**−2,873**	**<0,001**
Eukaryotic Translation Elongation	**−4,490**	**<0,001**	**−2,376**	**0,0104**
rRNA Processing	**−3,503**	**<0,001**	**−2,703**	**0,0015**
Ribosome Associated Quality Control	**−3,798**	**<0,001**	**−2,731**	**0,0013**
Respiratory Electron Transport	**−3,312**	**<0,001**	−1,594	0,1959
Aerobic Respiration and Respiratory Electron Transport	**−3,285**	**<0,001**	**−2,125**	**0,0362**
Metabolism of Amino Acids and Derivatives	**−3,338**	**<0,001**	**−2,945**	**<0,001**
Extracellular Matrix Organization	−1,415	0,2899	**3,314**	**<0,001**
NCAM1 Interactions	−1,390	0,2982	**2,510**	**0,0271**
Collagen Biosynthesis and Modifying Enzymes	−1,625	0,1988	**2,324**	**0,0497**
Metabolism of Carbohydrates and Carbohydrate Derivatives	1,888	0,0608	**2,477**	**0,0216**
Regulation of TP53 Activity Through Phosphorylation	**2,398**	**0,0089**	**−2,360**	**0,0100**
Transcriptional Regulation by TP53	**2,223**	**0,0177**	**−2,493**	**0,0055**
DNA Repair	**2,464**	**0,0063**	**−2,278**	**0,0154**

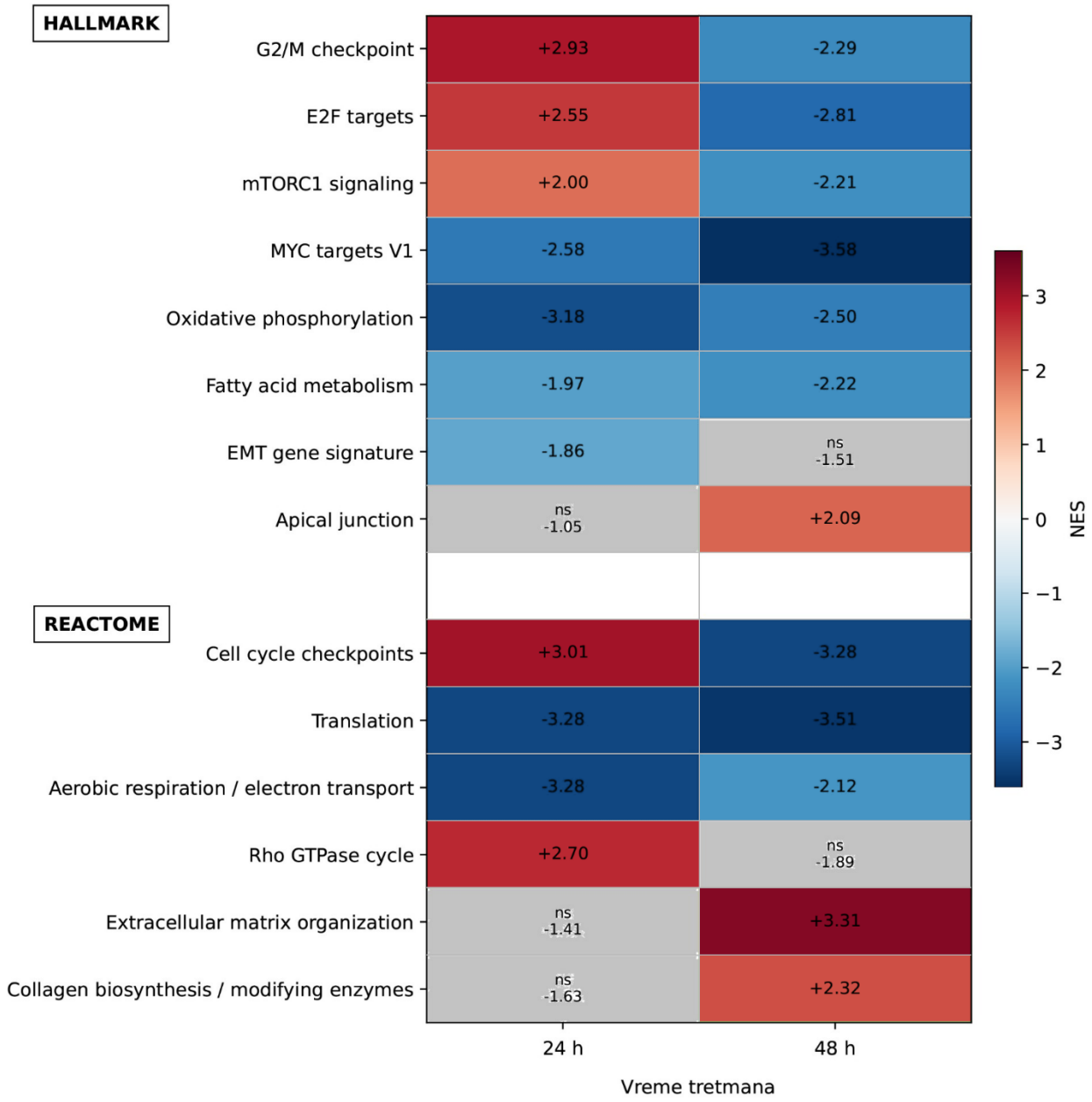
Podebljane NES i FDR q vrednosti označavaju statistički značajna obogaćenja genskih skupova, za koje su $P < 0,05$ i FDR $q < 0,05$.

Nakon 24 h tretmana, među najizraženijim pozitivno obogaćenim programima izdvojili su se oni povezani sa ćelijskim ciklusom i mitozom, uključujući G_2/M kontrolnu tačku (*Hallmark G2M Checkpoint; Reactome G2/M Checkpoints*), E2F-zavisnu transkripciju (*Hallmark E2F Targets*), mitotsko vreteno (*Hallmark Mitotic Spindle; Reactome Mitotic Spindle Checkpoint*), mitotski ćelijski

ciklus (*Reactome Cell Cycle, Mitotic*) i M fazu (*Reactome M Phase*). Pozitivno obogaćenje zabeleženo je i za programe povezane sa kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa (*Reactome Cell Cycle Checkpoints*) i G_2/M odgovorom na oštećenje DNK (*Reactome G2/M DNA Damage Checkpoint*). Pozitivno obogaćenje nakon 24 h uočeno je i za mTOR-povezane transkripcione programe (*Hallmark mTORC1 Signaling, Hallmark PI3K AKT mTOR Signaling*), kao i za programe povezane sa Rho familijom malih GTPaza (*Reactome Rho GTPase Cycle*).

Nasuprot tome, najizraženije negativno obogaćenje nakon 24 h odnosilo se na oksidativni metabolizam, uključujući oksidativnu fosforilaciju (*Hallmark Oxidative Phosphorylation*) i respiratorni transport elektrona (*Reactome Respiratory Electron Transport; Reactome Aerobic Respiration and Respiratory Electron Transport*), kao i na metabolizam masnih kiselina (*Hallmark Fatty Acid Metabolism*) i aminokiselina (*Reactome Metabolism of Amino Acids and Derivatives*). Izraženo negativno obogaćenje zabeleženo je i za translacione i ribozomske programe, uključujući translaciju (*Reactome Translation*), inicijaciju i elongaciju translacije (*Reactome Eukaryotic Translation Initiation, Reactome Eukaryotic Translation Elongation*) i obradu ribozomske RNK (rRNK) (*Reactome rRNA Processing*). Negativno obogaćenje pokazali su i MYC-povezani programi (*Hallmark MYC Targets V1*), kao i genski potpis povezan sa epitelno-mezenhimskom tranzicijom (*Hallmark Epithelial Mesenchymal Transition*).

Nakon 48 h tretmana je uočen nešto drugačiji obrazac obogaćenosti. Programi povezani sa ćelijskim ciklusom i G_2/M fazom, koji su nakon 24 h bili pozitivno obogaćeni, pokazali su izraženo negativno obogaćenje. Ovaj obrazac obuhvatao je G_2/M kontrolnu tačku (*Hallmark G2M Checkpoint; Reactome G2/M Checkpoints*), E2F-zavisnu transkripciju (*Hallmark E2F Targets*), kontrolne tačke ćelijskog ciklusa (*Reactome Cell Cycle Checkpoints*), mitotski ćelijski ciklus (*Reactome Cell Cycle, Mitotic*), M fazu (*Reactome M Phase*) i G_2/M odgovor na oštećenje DNK (*Reactome G2/M DNA Damage Checkpoint*). Slična vremenska promena uočena je i za mTORC1-povezani transkripcioni program (*Hallmark mTORC1 Signaling*), koji je nakon 24 h bio pozitivno, a nakon 48 h negativno obogaćen. Istovremeno, negativno obogaćenje MYC-povezanih programa (*Hallmark MYC Targets V1*), oksidativne fosforilacije (*Hallmark Oxidative Phosphorylation*) i metabolizma masnih kiselina (*Hallmark Fatty Acid Metabolism*) zadržano je u obe vremenske tačke. Negativno obogaćenje programa povezanih sa translacijom i ribozomskom funkcijom takođe je bilo prisutno i nakon 48 h, uključujući translaciju (*Reactome Translation*), inicijaciju i elongaciju translacije (*Reactome Eukaryotic Translation Initiation, Reactome Eukaryotic Translation Elongation*), obradu rRNK (*Reactome rRNA Processing*) i kontrolu kvaliteta ribozoma (*Reactome Ribosome Associated Quality Control*). Negativno je ostao obogaćen i program aerobne respiracije i respiratornog transporta elektrona (*Reactome Aerobic Respiration and Respiratory Electron Transport*). Nasuprot navedenim programima, nakon 48 h izraženo pozitivno obogaćenje uočeno je za organizaciju ekstracelularnog matriksa (*Reactome Extracellular Matrix Organization*), interakcije posredovane nervnim ćelijskim adhezionim molekulom 1 (eng. *neural cell adhesion molecule 1*, NCAM1) (*Reactome NCAM1 Interactions*) i biosintezu i modifikaciju kolagena (*Reactome Collagen Biosynthesis and Modifying Enzymes*). Pozitivno obogaćenje zabeleženo je i za programe povezane sa ćelijskim kontaktima (*Hallmark Apical Junction*) i metabolizmom ugljenih hidrata (*Reactome Metabolism of Carbohydrates and Carbohydrate Derivatives*). Programi povezani sa TP53 signalizacijom i popravkom DNK pokazali su složen vremenski obrazac i različit smer obogaćenosti u zavisnosti od korišćene kolekcije genskih skupova. Hallmark analiza pokazala je promenu smera za p53-povezani genski skup (*Hallmark P53 Pathway*) između 24 i 48 h, dok su Reactome programi povezani sa regulacijom i transkripcionom aktivnošću TP53 (*Reactome Regulation of TP53 Activity Through Phosphorylation, Reactome Transcriptional Regulation by TP53*) i popravkom DNK (*Reactome DNA Repair*) takođe pokazali vremenski zavisne promene, ali drugačijeg smera.



Slika 4.40. Odabrani Hallmark i Reactome genski skupovi identifikovani GSEA Preranked analizom A375 ćelija nakon 24 i 48 h tretmana sa 25 μM rilmenidina. Prikazane su vrednosti normalizovanog skora obogaćenosti (NES); pozitivan NES označava obogaćenost među genima sa povećanom, a negativan NES među genima sa smanjenom ekspresijom nakon tretmana. Rezultati koji ne ispunjavaju kriterijume $P < 0,05$ i FDR $q < 0,05$ označeni su kao ns i prikazani sivom bojom.

Sveukupno, GSEA analiza je ukazala na jasno vremenski zavisan transkripcioni odgovor A375 ćelija na rilmenidin (Slika 4.40). Najizraženija promena odnosila se na programe povezane sa ćelijskim ciklusom, koji su nakon 24 h bili pozitivno, a nakon 48 h negativno obogaćeni. Rano pozitivno obogaćenje G_2/M i E2F programa je bilo saglasno sa povećanjem udela ćelija u G_2/M fazi uočenim protočnom citometrijom, dok njihovo negativno obogaćenje nakon 48 h, uz održanu akumulaciju ćelija u G_2/M fazi i porast apoptotične populacije, ukazuje na prelazak od ranog odgovora povezanog sa kontrolom ćelijskog ciklusa ka kasnijem smanjenju transkripcionih programa potrebnih za njegovu progresiju. Nasuprot vremenski promenljivom odgovoru ćelijskog ciklusa,

programi povezani sa translacijom, MYC signalizacijom i oksidativnim metabolizmom pokazivali su pretežno negativno obogaćenje tokom posmatranog perioda, što ukazuje na smanjenje biosintetskih i energetskih programa ćelije. Promena smera *mTORC1 Signaling* između 24 i 48 h dodatno ukazuje da se rani i kasni transkripcioni odgovor na rilmenidin kvalitativno razlikuju. Vremenska zavisnost bila je prisutna i u programima povezanim sa citoskeletom i interakcijama sa ekstracelularnim matriksom. Rano obogaćenje *Rho GTPase Cycle* bilo je saglasno sa promenama adhezije uočenim tokom prvih 24 h, dok su nakon 48 h izraženije bile promene programa povezanih sa organizacijom ekstracelularnog matriksa, kolagenom i ćelijskim kontaktima. Ovaj kasniji obrazac je bio praćen povećanom ekspresijom gena za integrin α5 (*ITGA5*), paksilin (*PXN*), talin 1 (*TLN1*), matriksne metaloproteinaze 14 i 2 (*MMP14* i *MMP2*). Istovremeno, odsustvo pozitivnog obogaćenja EMT potpisa ukazuje da ove promene ne predstavljaju jednostavnu aktivaciju klasičnog EMT programa, već reorganizaciju adhezivnih, citoskeletnih i matriksnih procesa tokom odgovora na rilmenidin.

5. DISKUSIJA

Nišarin je multifunkcionalni skafold protein koji učestvuje u regulaciji više ćelijskih procesa značajnih za progresiju tumora, uključujući ćelijsku adheziju, organizaciju citoskeleta, migraciju, invazivnost, proliferaciju i signalne puteve povezane sa preživljavanjem ćelija (Alahari, 2003; Alahari et al., 2000; Baranwal et al., 2011; J. Li et al., 2015; Maziveyi et al., 2018). Dosadašnja istraživanja ukazuju na njegovu pretežno tumor-supresorsku ulogu, budući da je smanjena ekspresija NISCH opisana u više tipova maligniteta i povezana sa progresijom bolesti i nepovoljnijim kliničkim ishodom (Baranwal et al., 2011; J. Li et al., 2015; Zhao et al., 2020). U skladu sa tim, eksperimentalno povećanje ekspresije NISCH može ograničiti migraciju i invazivnost tumorskih ćelija, kao i rast tumora *in vivo*, između ostalog modulacijom interakcija ćelija sa ekstracelularnim matriksom i signalizacije posredovane FAK i ERK proteinima (Baranwal et al., 2011; J. Li et al., 2015; Maziveyi et al., 2018). Dodatni razlog zbog kog je nišarin farmakološki interesantan jeste njegova povezanost sa imidazolinskim I_1-receptorskim sistemom. Poseban translacioni značaj proizlazi iz činjenice da se među ligandima ovog receptorskog sistema nalaze i lekovi koji se koriste u kliničkoj praksi, prvenstveno kao centralno delujući antihipertenzivi, uključujući klonidin, moksonidin i rilmenidin (Bousquet et al., 2020). Pored njihove dobro poznate primene u terapiji kardiovaskularnih bolesti, pretklinička istraživanja ukazala su i na njihov antitumorski potencijal, pri čemu je posebno za rilmenidin pokazano antiproliferativno i proapoptotsko delovanje, kao i sposobnost modulacije procesa povezanih sa adhezijom, migracijom i metastatskim širenjem tumorskih ćelija (Srdic-Rajic et al., 2016; Živić et al., 2026). S obzirom na navedeno, postoji mogući potencijal za prenamenu klinički korišćenih agonista imidazolinskih I_1-receptora za primenu u onkologiji koji je potrebno dodatno istražiti.

Polazeći od dosadašnjih saznanja o tumor-supresorskoj funkciji nišarina, u ovoj disertaciji je ispitana njegova potencijalna uloga u biologiji melanoma. Analizirane su promene ekspresije nišarina na nivou informacione RNK i proteina, potencijalni mehanizmi odgovorni za regulaciju njegove ekspresije, kao i njegov prognostički značaj u melanomu. Pored toga, ispitivana je povezanost ekspresije *NISCH* sa molekularnim i signalnim procesima relevantnim za progresiju melanoma korišćenjem javno dostupnih transkriptomskih skupova podataka. Imajući u vidu izražene polne razlike u biologiji i kliničkom toku melanoma, poseban deo analiza bio je usmeren na ispitivanje razlika u prognostičkom i funkcijskom značaju *NISCH* između žena i muškaraca.

Drugi deo istraživanja je bio usmeren na ispitivanje mogućnosti farmakološke modulacije imidazolinskog I_1-receptorskog sistema. Efekti agonista imidazolinskih I_1-receptora, klonidina, moksonidina i rilmenidina, ispitani su u panelu humanih ćelijskih linija melanoma, kao i u netumorskim ćelijama. Nakon početne procene njihovog uticaja na vijabilnost ćelija, detaljnije su analizirani efekti odabranog agoniste na rast melanoma u dvodimenzionalnim i trodimenzionalnim modelima, regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze, migratorni i invazivni potencijal, kao i adhezivna svojstva ćelija. U cilju sagledavanja molekularne osnove uočenih fenotipskih promena, analizirane su i promene na transkriptomskom nivou. Na ovaj način, istraživanje je omogućilo integrisano sagledavanje značaja nišarina u progresiji melanoma, kao i potencijala farmakološkog delovanja agonista imidazolinskih I_1-receptora u modelu ćelija melanoma *in vitro*.

5.1. Ekspresija i klinički značaj nišarina u melanomu

Analiza javno dostupnih skupova podataka i uzoraka pacijenata operisanih na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije je pokazala smanjenu ekspresiju NISCH u melanomu u odnosu na normalnu kožu i nevuse. To je u skladu sa prethodno opisanom tumor-supresorskom ulogom nišarina u drugim malignitetima (J. Li et al., 2015; Maziveyi & Alahari, 2015). Dalje poređenje primarnih i metastatskih melanoma nije pokazalo značajnu razliku, što navodi na zaključak da se njegova

ekspresija ne smanjuje progresivno sa napretkom bolesti, iako je uočljiv trend nižih nivoa *NISCH* u metastazama u limfnim čvorovima u IORS kohorti. S obzirom na kompleksnost nastanka metastaza, razlike u ekspresiji NISCH između primarnih i metastatskih lezija ne treba tumačiti kao posledicu linearnog toka tumorske progresije, već mogu biti i posledica selekcije i širenja različitih tumorskih subklonova tokom metastatske diseminacije, prilagođavanja organ-specifičnoj mikrosredini, ali i posledica različite zastupljenosti malignih, imunskih, stromalnih i endotelnih ćelija u analiziranim uzorcima (G. M. Fischer et al., 2019; Sanborn et al., 2015; Tirosh et al., 2016). Za razliku od karcinoma dojke, gde je niža ekspresija *NISCH* povezana je sa invazivnijim fenotipom i višim gradusom tumora, i karcinoma jajnika, u kojem je gubitak nišarina bio povezan sa višim histološkim gradusom, uznapredovalim stadijumom i prisustvom metastaza u limfnim čvorovima (Baranwal et al., 2011; J. Li et al., 2015), u ispitivanim uzorcima melanoma u ovoj studiji nije utvrđena značajna povezanost nivoa *NISCH* iRNK sa analiziranim kliničkim i patohistološkim karakteristikama pacijenata. Jedno od mogućih objašnjenja ovakvih rezultata jeste da smanjenje NISCH u primarnom melanomu predstavlja rani događaj koji doprinosi gubitku regulatornih mehanizama odgovornih za ograničavanje progresije tumora. Ukoliko se smanjenje NISCH odigrava već tokom prelaska iz radijalne u vertikalnu fazu rasta melanoma, ono bi moglo pružiti selektivnu prednost ćelijama koje stiču sposobnost odvajanja, migracije i invazije, dok njegovo dodatno smanjenje u već formiranim metastazama ne bi nužno bilo potrebno, što je u skladu sa odsustvom daljeg smanjenja NISCH u metastatskim uzorcima analiziranim u ovom istraživanju. Međutim, ovi mehanizmi nisu direktno ispitivani u okviru ovog istraživanja i predstavljaju hipoteze koje bi trebalo proveriti u budućim funkcijskim studijama.

Pored nivoa ekspresije, iznenađujuća je bila i subćelijska lokalizacija nišarina. Nišarin je prvobitno opisan kao pretežno citosolni protein koji interaguje sa citoplazmatskim domenom integrina α5 i inhibira migraciju ćelija (Alahari et al., 2000). Kasnije je pokazano da se NISCH nalazi u citoplazmi, perinukleusnim vezikularnim strukturama i membranskim naborima, gde kolokalizuje sa aktiviranim PAK1 i učestvuje u prostorno ograničenoj regulaciji Rac1-PAK signalizacije i ćelijske pokretljivosti (Alahari et al., 2004; Baranwal et al., 2011; Jain et al., 2013). Međutim, u analiziranim uzorcima melanoma je pored citoplazmatskog signala uočeno i perinukleusno i nukleusno bojenje. Perinukleusna lokalizacija NISCH je ranije zabeležena i u neuronima, gde je protein detektovan u perinukleusnom regionu i dendritima (Ding et al., 2015). Kako su prethodna istraživanja bila pretežno usmerena na njegove citoplazmatske i membranski povezane funkcije, moguća funkcija nišarina u nukleusu nije ranije okarakterisana. Nukleocitoplazmatski transport, odnosno kontinuirano premeštanje između nukleusi i citoplazme u oba smera, je dobro opisan regulatorni mehanizam kojim se prostorno kontroliše dostupnost proteina njihovim funkcijskim partnerima (Gama-Carvalho & Carmo-Fonseca, 2001). Zbog toga akumulacija proteina u nukleusu može biti praćena sticanjem novih nukleusnih funkcija, ali i gubitkom dela citoplazmatskih interakcija, a značaj ovog procesa je zavistan od biološkog konteksta. Primer koji pruža mehanističku analogiju za tumačenje promenjene lokalizacije nišarina je i fokalna adheziona kinaza FAK. Iako je FAK prvenstveno poznata kao komponenta fokalnih adhezija i regulator signala koji povezuju ekstracelularni matriks sa citoskeletom, pokazano je da se u tumorskim ćelijama može naći i u nukleusu. U studiji iz 2015. godine, nukleusni FAK je preko nukleusnih partnera kontrolisao ekspresiju hemokina, čime je doprinosio regrutovanju regulatornih T limfocita i izbegavanju antitumorskog imunskog odgovora (Serrels et al., 2015). Prema tome, nukleusna lokalizacija uočena u ćelijama melanoma otvara mogućnost da subćelijska raspodela nišarina zavisi od konteksta i da NISCH u melanocitnoj liniji može ostvarivati funkcije koje nisu obuhvaćene njegovim do sada opisanim delovanjem. S druge strane, nukleusna akumulacija nišarina bi mogla smanjiti njegovu dostupnost za interakcije sa komponentama adhezivnog i citoskeletnog aparata, čime bi se njegova klasična inhibitorna uloga u migraciji mogla oslabiti i bez velikih promena u ekspresiji.

Analiza protein-kodirajućih transkripata gena *NISCH* je pokazala da je ekspresija svih analiziranih transkripata bila statistički značajno niža u melanomu nego u normalnoj koži, pri čemu se relativna zastupljenost pojedinačnih izoformi nije izraženo menjala. Izoforma 1 je ostala dominantno zastupljena kako u tumorskim tako i u odgovarajućim zdravim tkivima. Očuvana

dominacija izoforme 1 može biti funkcijski značajna, budući da ona predstavlja protein pune dužine koji sadrži strukturne regione neophodne za poznate funkcije nišarina. Zbirno, dobijeni rezultati ne ukazuju na selektivni gubitak funkcijski kompletne izoforme, već na smanjenje ukupne transkripcione dostupnosti gena. Takvo tumačenje je u skladu sa prethodnim rezultatima iz drugih maligniteta, u kojima je smanjena ekspresija *NISCH* povezivana sa genetičkim i epigenetičkim promenama (Baranwal et al., 2011; J. Li et al., 2015). Dodatno, gen *NISCH* se nalazi u regionu 3p21.1, na kratkom kraku hromozoma 3, u okviru šire hromozomske oblasti u kojoj su učestali alelski gubici opisani u različitim epitelnim malignitetima, uključujući karcinome bubrega, dojke i jajnika (Loginov et al., 2008).

U karcinomu dojke su gubitak heterozigotnosti i mikrodelecije unutar lokusa *NISCH* bili povezani sa nižom ekspresijom gena i agresivnijim osobinama tumora (Baranwal et al., 2011). S druge strane, u raku jajnika je pokazana povezanost gubitka ekspresije *NISCH* sa hipermetilacijom njegovog promotorskog regiona (J. Li et al., 2015). U ovoj disertaciji, analizom uzoraka iz IORS kohorte, mikrodelecije su pronađene i u melanomu, sa učestalošću od približno 30 % u metastazama limfnih čvorova i 40 % u udaljenim metastazama u analiziranom materijalu. Iako veličina kohorte ograničava pouzdanu procenu učestalosti, prisustvo promena u obe metastatske grupe u tumorima sa niskim nivoima *NISCH* ekspresije podržava pretpostavku da delecione promene koje obuhvataju gen *NISCH* mogu doprineti smanjenju ekspresije u delu tumora. Javne kohorte daju nezavisnu potporu ovom zaključku. Plitke delecije regiona koji obuhvata gen *NISCH* su bile prisutne kod približno petine bolesnika u TCGA i oko 15 % u DFCI skupu, i bile su povezane sa nižim nivoom transkripta. Nasuprot tome, dobitak kopija bio je povezan sa višom ekspresijom, dok amplifikacije nisu bile dovoljno česte da bi se pokazao značajan efekat. Ovakva raspodela pokazuje da kopijski gubici *NISCH* nisu prisutni u većini melanoma i da promene broja kopija same po sebi ne mogu objasniti široko rasprostranjeno smanjenje ekspresije *NISCH* u melanomu, ali da delecione promene ovog genskog regiona mogu doprineti smanjenoj ekspresiji gena u podgrupi tumora. Takođe, povećanje broja kopija *NISCH* nije bilo praćeno proporcionalnim porastom nivoa njegove iRNK u svim uzorcima, što dodatno ukazuje da odnos između broja kopija gena i njegove transkripcione aktivnosti nije neposredan, kao i da na ekspresiju *NISCH* utiču i drugi regulatorni mehanizmi. Stoga je sprovedena je i epigenetička analiza koja je pokazala hipermetilaciju promotorskog regiona *NISCH* u 3 od 8 primarnih tumora, 8 od 10 metastaza u limfnim čvorovima i svih 5 analiziranih udaljenih metastaza. Iako razlika između grupa u materijalu nije dostigla statističku značajnost, smer promene i visoka učestalost u metastatskim uzorcima pokazuju da ovo ipak može biti jedan od načina regulacije ekspresije nišarina u melanomu, što je u skladu i sa nalazom u karcinomu jajnika (J. Li et al., 2015).

Genetički i epigenetički mehanizmi smanjenja ekspresije *NISCH* verovatno nisu međusobno isključivi. Knudsonov model „dvostrukog udara“, iako prvobitno formulisan u pogledu mutacionih događaja, danas predviđa da se funkcija tumor-supresorskog gena može izgubiti kombinacijom različitih događaja, kao što su inaktivacione mutacije, delecije, gubitak heterozigotnosti i epigenetičko utišavanje promotora (Knudson, 1971). Prema tome, dva događaja ne moraju biti istog tipa, a krajnja posledica bi bila funkcionalna bialelna inaktivacija gena. Direktan primer kombinovanja genetičkog i epigenetičkog mehanizma opisan je za tumor-supresorski gen *VHL* (eng. *von Hippel–Lindau tumor suppressor*) u karcinomu bubrega. Hipermetilacija promotora *VHL* pronađena je u pet tumora, od kojih su četiri istovremeno izgubila jednu kopiju gena, što pokazuje da gubitak jednog alela može biti praćen metilacionim utišavanjem preostalog (Herman et al., 1994). Epigenetička inaktivacija preostalog funkcionalnog alela kao drugi udar pokazana je i za gen za kadherin 1 (*CDH1*) u naslednom difuznom karcinomu želuca (Grady et al., 2000). U tom smislu, deleciona promena *NISCH*, koja je kompatibilna sa gubitkom jedne kopije gena, mogla bi biti udružena sa metilacionim utišavanjem preostalog alela i time doprineti izraženijem smanjenju ekspresije nišarina. U pojedinim uzorcima IORS kohorte istovremeno su detektovane mikrodelecije i hipermetilacija promotora *NISCH*, a koegzistencija različitih tipova promena uočena je i analizom TCGA SKCM podataka. To navodi na zaključak da smanjena ekspresija nišarina u pojedinim tumorima može biti posledica kombinovanog delovanja više regulatornih mehanizama. Sličan

obrazac opisan je u karcinomu jajnika, gde su u istoj kohorti identifikovani i promotorska hipermetilacija i gubitak heterozigotnosti *NISCH* gena, pri čemu je hipermetilacija bila znatno češća (J. Li et al., 2015).

Pored genetičkih i epigenetičkih promena, ekspresija *NISCH* može biti regulisana i posttranskripciono, putem mikroRNK. MikroRNK su kratke nekodirajuće RNK koje vezivanjem za ciljne informacione RNK, najčešće u njihovom 3′ netranslatirajućem regionu (eng. *untranslated region*, 3′UTR), mogu uticati na stabilnost transkripta i njegovu translaciju. U karcinomu dojke pokazano je da se miR-23b i miR-27b direktno vezuju za 3′UTR region *NISCH* i smanjuju njegovu ekspresiju, dok je njihovo utišavanje dovodilo do povećanja nivoa nišarina i smanjenja proliferacije, migracije i invazije tumorskih ćelija, kao i tumorskog rasta *in vivo* (Jin et al., 2013). Slično tome, u skvamoznom karcinomu glave i vrata funkcijskim pristupima je potvrđena direktna interakcija miR-2355-5p i *NISCH*, pri čemu je pokazano da miR-2355-5p negativno reguliše ekspresiju *NISCH*, dok je njen povećan nivo bio povezan sa smanjenom ekspresijom NISCH i pojačanom proliferacijom tumorskih ćelija (H. Zhang et al., 2021). Ovi rezultati ukazuju da regulacija posredovana mikroRNK može predstavljati dodatni mehanizam modulacije nivoa NISCH u malignim ćelijama. Međutim, analiza TCGA podataka pomoću *OncomiR* platforme nije pokazala značajne korelacije između ekspresije *NISCH* i analiziranih mikroRNK u TCGA tumorima (Ostojić et al., 2024). Stoga uloga posttranskripcione regulacije posredovane mikroRNK u smanjenju ekspresije *NISCH* u melanomu za sada ostaje neistražena.

Mutacije gena *NISCH* u analiziranim kohortama melanoma su bile retke, prisutne u približno 3,86 % uzoraka u TCGA SKCM i 5,79 % uzoraka u DFCI kohorti. Odsustvo čestih rekurentnih događaja potpune bialelne inaktivacije *NISCH* ne odgovara obrascu klasičnog, strogo recesivnog tumor-supresorskog gena, već podaci podržavaju mogućnost da NISCH deluje kao kontekstno i dozno-zavisni regulatorni protein i modifikator tumorskog fenotipa. Sličan princip je potvrđen i za tumor-supresorske gene za inhibitor ciklin-zavisne kinaze 1B (*CDKN1B*, koji kodira p27Kip1) i DICER1, endoribonukleazu Dicer (*DICER1*), kao i za PTEN kod kojeg su i relativno male promene nivoa proteina uticale na intenzitet AKT signalizacije i podložnost nastanku tumora (Alimonti et al., 2010; Fero et al., 1998; Kumar et al., 2009). Za NISCH je eksperimentalno pokazano da smanjenje endogenog nivoa povećava aktivnost PAK i migraciju ćelija, što pokazuje da smanjenje njegovog nivoa može imati funkcionalne posledice i bez dokazane potpune inaktivacije gena (Alahari et al., 2004). To ide u prilog kontinuiranom modelu tumor-supresije prema kojem biološki efekat zavisi od količine funkcionalnog proteina, umesto od jednostavnog odnosa između potpuno očuvane i potpuno izgubljene funkcije.

U ukupno analiziranoj grupi pacijenata viša ekspresija *NISCH* je bila povezana sa nepovoljnijim ishodom bolesti, što se razlikovalo od rezultata dobijenih u drugim malignitetima, gde je viša ekspresija *NISCH* povezivana sa povoljnijom prognozom. U karcinomu jajnika viša ekspresija *NISCH* je bila povezana sa dužim ukupnim preživljavanjem (J. Li et al., 2015), dok je u karcinomu dojke bila povezana sa dužim preživljavanjem bez recidiva (Baranwal et al., 2011). S obzirom na to da su prethodna istraživanja prognostičkog značaja nišarina najvećim delom sprovedena u malignitetima karakterističnim za žene, prognostička vrednost *NISCH* u primarnom melanomu dodatno je analizirana odvojeno kod pacijenata muškog i ženskog pola. Stratifikacija prema polu pokazala je suprotan smer povezanosti ekspresije *NISCH* sa ishodom bolesti: viša ekspresija bila je povezana sa povoljnijim ishodom kod žena, a sa nepovoljnijim kod muškaraca. Takvo tumačenje je u skladu sa sve većim brojem dokaza da pol može uticati ne samo na incidenciju i klinički tok malignih bolesti, već i na njihovu molekularnu osnovu i prognostički značaj pojedinačnih biomarkera. Sveobuhvatne analize različitih tipova tumora su pokazale polne razlike u mutacionom opterećenju i učestalosti promena pojedinih pokretačkih gena tumora (eng. *cancer driver genes*), kao i postojanje biomarkera čija se povezanost sa kliničkim ishodom razlikuje između muškaraca i žena (C. H. Li et al., 2018). U skladu sa mogućim postojanjem polno specifičnih molekularnih razlika, analiza mutacionog statusa gena *NISCH* u TCGA SKCM skupu podataka pokazala je da su njegove mutacije, iako ukupno retke, češće zabeležene u uzorcima muškaraca. Mogućnost polno zavisnog prognostičkog značaja posebno je relevantna za melanom, kod kojeg je pol dobro utvrđen

prognostički faktor. Žene sa melanomom imaju povoljniji tok bolesti i bolje preživljavanje od muškaraca, pri čemu se ova prednost ne može u potpunosti objasniti razlikama u starosti, lokalizaciji tumora ili standardnim histopatološkim i kliničkim prognostičkim faktorima (de Vries et al., 2008; Joosse et al., 2012; Lasithiotakis et al., 2008). Pokazano je da žene imaju približno 30 % relativnu prednost u pogledu različitih pokazatelja progresije lokalizovanog melanoma, koja se ogledala u boljem ukupnom i melanoma-specifičnom preživljavanju, kao i manjem riziku od razvoja regionalnih i udaljenih metastaza (Joosse et al., 2012). Kao moguća osnova ovih razlika razmatraju se efekti polnih hormona, hromozomske razlike, razlike u imunskom odgovoru i metabolizmu, kao i različita izloženost spoljašnjim faktorima (Haupt et al., 2021). Važno je napomenuti i da u ovom istraživanju nisu utvrđene značajne razlike u nivou ekspresije *NISCH* između melanoma muškaraca i žena, te se razlika u prognostičkom značenju *NISCH* ne može jednostavno objasniti razlikom u količini njegove ekspresije između polova. Verovatnije je da isti ili sličan nivo *NISCH* može imati različite funkcionalne posledice u zavisnosti od šireg molekularnog, metaboličkog, imunološkog ili mikrosredinskog konteksta tumora, koji se može razlikovati između žena i muškaraca. U tom smislu, prognostička vrednost *NISCH* mogla bi da odražava ne samo njegov nivo ekspresije već i različite signalne i ćelijske programe sa kojima je njegova ekspresija povezana u tumorima dva pola. Dodatnu osnovu za ovakvu pretpostavku pružaju rezultati iz eksperimentalnih modela koji nisu povezani sa malignim bolestima. Metaboličke posledice poremećene funkcije NISCH u mišjem modelu su bile polno dimorfne i uključivale su razlike u raspodeli masnog tkiva, metabolizmu glukoze i insulinskoj osetljivosti (Dong et al., 2019). Iako ovi rezultati ne omogućavaju neposredno povezivanje metaboličkog fenotipa miševa sa prognostičkom ulogom nišarina u melanomu, oni pokazuju da biološke posledice promene funkcije nišarina mogu zavisiti od pola i pružaju dodatnu osnovu za ispitivanje mehanizama koji bi mogli biti odgovorni za različitu povezanost *NISCH* sa ishodom bolesti kod žena i muškaraca.

GSEA analiza je pružila mogući molekularni okvir značaja nišarina u melanomu. Imajući u vidu da je dosadašnja uloga nišarina u malignim bolestima istraživana samo u tumorima karakterističnim za žene, kao i prethodno uočene razlike u prognostičkom značaju *NISCH* između žena i muškaraca sa melanomom, analiza obogaćenosti genskih skupova sprovedena je odvojeno prema polu pacijenata. Bez obzira na pol, ekspresija *NISCH* je bila značajno povezana sa većim brojem metaboličkih i signalnih puteva, što je u skladu sa sve većim brojem podataka koji ukazuju na ulogu nišarina u regulaciji ćelijske i sistemske metaboličke homeostaze (Dong et al., 2017; Nguyen et al., 2022). Među zajedničkim rezultatima kod žena i muškaraca posebno se izdvajala negativna povezanost ekspresije *NISCH* gena sa genskim programima uključenim u mTORC1 signalizaciju, metabolizam glukoze i ciklus trikarboksilnih kiselina. Povezanost nišarina sa mTORC1 signalizacijom je posebno interesantna imajući u vidu centralnu ulogu ovog kompleksa u integraciji signala koji regulišu ćelijski rast, proliferaciju i metabolizam, kao i značaj njegove aktivacije u biologiji melanoma (Damsky et al., 2015). Moguća veza NISCH sa ovom signalnom osom podržana je i ranijim eksperimentalnim rezultatima koji su pokazali da NISCH fizički interaguje sa tumor-supresorskom kinazom LKB1 i da njihova zajednička aktivnost ograničava migraciju ćelija karcinoma dojke (Jain et al., 2013). LKB1 predstavlja jedan od glavnih aktivatora AMPK, koja u uslovima energetskog stresa može ograničiti mTORC1 signalizaciju (Gwinn et al., 2008; Woods et al., 2003). Još neposrednija veza pokazana je u modelu miševa sa mutacijom koja dovodi do gubitka funkcije gena *NISCH*. Utvrđeno je da nišarin ostvaruje interakciju sa AMPK i inhibira njenu aktivnost, dok je gubitak funkcije nišarina doveo do pojačane aktivacije AMPK i posledičnog smanjenja mTOR signalizacije (Dong et al., 2017). Ovi rezultati ukazuju na funkcionalnu povezanost NISCH sa AMPK-mTOR signalnim putem, mada se njen značaj i smer delovanja mogu razlikovati u zavisnosti od ćelijskog i metaboličkog konteksta. Složenost uloge nišarina u metabolizmu potvrđuju i rezultati različitih mišjih modela. Dok je u modelu sa delecijom regiona ponovljenih motiva bogatih leucinom (LRR) povećana aktivacija AMPK bila povezana sa promenama metabolizma glukoze i energetskog utroška (Dong et al., 2017), potpuni gubitak NISCH u drugom eksperimentalnom modelu doveo je do smanjene oksidativne metaboličke aktivnosti i produkcije adenozin-trifosfata, tj. ATP-a (Nguyen et al., 2022). Pored toga, metaboličke posledice gubitka funkcije NISCH razlikovale su se

između mužjaka i ženki, naročito u pogledu metabolizma glukoze i insulinske osetljivosti (Dong et al., 2019). Ovi podaci podržavaju mogućnost da odnos između nišarina i metaboličkih puteva zavisi kako od biološkog konteksta tako i od pola.

Pored zajedničkih metaboličkih obrazaca, GSEA je pokazala i razlike između žena i muškaraca. Posebno su se izdvojili genski programi povezani sa replikacijom i popravkom DNK. Kod muškaraca je viša ekspresija gena *NISCH* bila negativno povezana sa putevima nukleotidne ekscizione reparacije i regulacije kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, dok kod žena takav obrazac nije uočen. Nukleotidna eksciziona reparacija predstavlja jedan od ključnih mehanizama uklanjanja oštećenja DNK nastalih dejstvom UV zračenja, zbog čega je posebno značajna u biologiji melanoma (Kusakabe et al., 2019). Istovremeno, prethodne genomske analize pokazale su veće mutaciono opterećenje melanoma kod muškaraca nego kod žena (Gupta et al., 2015), što je i u ovoj studiji uočeno u kontekstu gena *NISCH*. Ovi rezultati ukazuju da odnos između ekspresije *NISCH* i transkripcionih programa koji kontrolišu održavanje genomske stabilnosti može zavisiti od pola pacijenta. Sa druge strane, kod žena, ali ne i kod muškaraca, viša ekspresija gena *NISCH* je bila pozitivno povezana sa skupovima WNT signalizacije. Među genima koji su doprinosili ovoj povezanosti bili su *WNT8B, WNT6, WNT3A* i *WNT8D*. WNT signalizacija ima ključnu ulogu u razvoju nervne kreste, iz koje potiču melanociti, a pojedini WNT ligandi, uključujući WNT6 i WNT8, učestvuju u njenoj indukciji tokom embrionalnog razvoja (Ji et al., 2019; Lewis et al., 2004; Schmidt et al., 2007). Međutim, uloga ovih liganada u biologiji melanoma je znatno manje razjašnjena. Posebno je interesantna pozitivna povezanost gena *NISCH* sa *WNT3A* u uzorcima pacijentkinja, jer, iako kanonska WNT/β-katenin signalizacija u melanomu ima kontekstno zavisne efekte, u pojedinim modelima njena aktivacija je povezana sa nižom proliferativnom aktivnošću tumora i povoljnijim preživljavanjem pacijenata (Chien et al., 2009). Pored toga, aktivacija WNT/β-katenin signalizacije je pojačavala apoptotski odgovor $BRAF^{V600E}$ mutantnih ćelija melanoma na inhibiciju BRAF, pri čemu je WNT3A učestvovao u ovom efektu (Biechele et al., 2012; Chien et al., 2014). Ovi radovi daju biološku osnovu za pretpostavku da pozitivna povezanost ekspresije *NISCH* sa WNT signalizacijom, a naročito sa *WNT3A*, uočena isključivo u tumorima pacijentkinja može ukazivati na polno specifičan molekularni kontekst u kojem je viša ekspresija nišarina povezana sa diferenciranijim ili terapijski osetljivijim fenotipom melanoma i stoga doprinosi povoljnijem prognostičkom značaju više ekspresije *NISCH* kod žena. Ipak, WNT/β-katenin signalizacija u melanomu nema univerzalno tumor-supresorsko dejstvo, već njeni efekti zavise od molekularnog, ćelijskog i mikrosredinskog konteksta, zbog čega ovu povezanost treba posmatrati kao hipotezu koja zahteva dalja ispitivanja i funkcionalnu potvrdu.

Kada se ovi rezultati sagledaju zajedno, ukazuju na različit molekularni kontekst u kojem se nišarin eksprimira kod melanoma žena i muškaraca, i pružaju osnovu za dalje funkcijski ispitivanje njegove povezanosti sa metaboličkim, proliferativnim i reparacionim signalnim putevima.

5.2. Antitumorski efekti agonista imidazolinskih I_1-receptora u ćelijskim modelima melanoma

Rezultati dobijeni analizom tumorskih uzoraka ukazuju na mogući biološki i prognostički značaj NISCH u melanomu, ali i otvaraju nova pitanja o uzročno-posledičnoj ulozi ovog proteina, kao i o efektima njegove farmakološke modulacije. Budući da NISCH učestvuje u kontroli ćelijske adhezije i pokretljivosti (Alahari et al., 2000, 2004; Maziveyi et al., 2018) koje su ključne za invaziju i metastatsko širenje (Lambert et al., 2017), farmakološka modulacija signalnih puteva povezanih sa NISCH predstavlja potencijalno interesantan pristup za ispitivanje antitumorskog delovanja. Imajući u vidu funkcionalnu povezanost NISCH sa I_1-receptorskim sistemom (Bousquet et al., 2020; Piletz et al., 2000; J. Zhang & Abdel-Rahman, 2006), naredni deo istraživanja je bio usmeren na ispitivanje uticaja ova tri leka na ćelije melanoma *in vitro*, sa ciljem procene njihovog antitumorskog potencijala i mogućnosti farmakološke prenamene u onkologiji.

Pre ispitivanja efekata agonista imidazolinskih I_1-receptora, ekspresija *NISCH* je određena u panelu humanih ćelijskih linija melanoma i netumorskih ćelija kako bi se odabrali odgovarajući

modeli za dalje funkcionalne analize. NISCH je detektovan u svim ispitivanim ćelijskim linijama melanoma, pri čemu su najviši nivoi iRNK i proteina zabeleženi u A375 ćelijama. Razlike u ekspresiji između pojedinih ćelijskih linija nisu neočekivane imajući u vidu izraženu molekularnu i fenotipsku heterogenost melanoma. Najupadljivija razlika bila je gotovo potpuna odsutnost ekspresije NISCH u A375R ćelijama rezistentnim na vemurafenib. Ova ćelijska linija je dobijena postepenom selekcijom parentalne linije A375, koja je među ispitivanim ćelijskim linijama imala najviši nivo ekspresije nišarina. Ovakva izrazita razlika između genetički srodnih parentalnih i rezistentnih ćelija ukazuje na povezanost gubitka ekspresije nišarina sa fenotipom stečene rezistencije, ali potrebno je razjasniti da li smanjena ekspresija NISCH doprinosi nastanku rezistencije ili predstavlja posledicu molekularnih promena koje prate njeno sticanje.

Pored nivoa ekspresije, analizirana je i subćelijska raspodela nišarina u A375 ćelijama fluorescentnom mikroskopijom. Bojenje NISCH se najvećim delom preklapalo sa nukleusnim regionom obeleženim DAPI bojom, dok je signal u citoplazmi bio slab. Ovaj nalaz je u skladu sa nukleusnim bojenjem uočenim u uzorcima melanoma pacijenata iz IORS kohorte i *Human Protein Atlas* baze, što dodatno ukazuje da subćelijska raspodela nišarina u melanomu može odstupati od njegove prethodno opisane pretežno citoplazmatske i membranske lokalizacije (Alahari et al., 2004; Baranwal et al., 2011; Jain et al., 2013).

Početno ispitivanje efekata klonidina, moksonidina i rilmenidina MTT testom u konvencionalnoj dvodimenzionalnoj kulturi pokazalo je da, među ispitivanim lekovima, rilmenidin ispoljava najizraženije dejstvo. Ovaj efekat zabeležen je u svim ispitivanim humanim ćelijskim linijama melanoma, što ukazuje da aktivnost rilmenidina nije bila ograničena na samo jedan ćelijski i molekularni kontekst. Najizraženiji odgovor uočen je na A375 i 518a2 ćelijama, koje nose aktivirajuću mutaciju *BRAF*^{V600E} (Grahovac et al., 2019), potencijalno zbog izraženih proliferativnih i metaboličkih promena do kojih dovodi konstitutivna aktivacija MAPK/ERK signalnog puta (Haq et al., 2013; Parmenter et al., 2014). IC_{50} vrednosti rilmenidina određene nakon 72 sata u ovim ćelijama bile su znatno niže od vrednosti dobijenih pod uporedivim uslovima u ćelijskim linijama pankreasnog duktalnog adenokarcinoma (Živić et al., 2026) i karcinoma kolona (Ostojić et al., 2024). Istovremeno, bile su približne IC_{50} vrednosti od 55,25 μM koja je prethodno utvrđena u leukemijskim ćelijama K562 nakon 48 sati tretmana rilmenidinom (Srdic-Rajic et al., 2016). Ispitivani netumorski ćelijski modeli kože bili su znatno manje osetljivi od ćelija melanoma, sa IC_{50} vrednostima koje su premašivale 200 μM, što ukazuje na izvestan stepen selektivnosti rilmenidina prema tumorskim ćelijama. A375 ćelije, koje su imale najviši nivo ekspresije *NISCH*, ujedno su pokazale i najizraženije smanjenje MTT signala. Nasuprot tome, vemurafenib-rezistentna sublinija A375R, u kojoj je ekspresija *NISCH* bila izrazito smanjena, nije pokazala značajan odgovor na rilmenidin. Podudarnost niske ekspresije *NISCH* i izostanka odgovora na rilmenidin u A375R ćelijama u skladu je sa hipotezom da je nivo NISCH značajan za osetljivost ćelija melanoma na ovaj lek.

Budući da konvencionalna dvodimenzionalna kultura ne može da reprodukuje prostornu organizaciju, međućelijske kontakte i gradijente prisutne u solidnim tumorima, dejstvo rilmenidina je dodatno ispitano u modelu višećelijskih tumorskih sferoida. Trodimenzionalna organizacija omogućava uspostavljanje složenijih ćelijsko-ćelijskih i ćelijsko-matriksnih interakcija, kao i gradijenata kiseonika, hranljivih materija, metabolita i pH, zbog čega se proliferacija, ekspresija gena, ćelijska signalizacija i odgovor na lekove mogu znatno razlikovati od onih u monoslojnoj kulturi (Edmondson et al., 2014; Pinto et al., 2020). Iako ne reprodukuju u potpunosti složenost tumorskog mikrookruženja, uključujući vaskularne, stromalne i imunske komponente, sferoidi predstavljaju koristan eksperimentalni nivo između jednostavnih 2D sistema i kompleksnijih modela *in vivo*. U skladu sa ovim razlikama, prethodno formirani sferoidi A375 i 518a2 pokazali su znatno manju osetljivost na rilmenidin nego iste ćelije kultivisane u 2D uslovima, tj. IC_{50} vrednosti su bile višestruko veće od IC_{50} vrednosti određenih u monoslojnoj kulturi. Smanjena osetljivost sferoida se često uočava i pri primeni drugih antitumorskih agenasa i može biti posledica više međusobno povezanih faktora, uključujući ograničenu difuziju leka, smanjenu proliferativnu aktivnost ćelija u unutrašnjim slojevima, hipoksiju, metaboličku heterogenost i promene signalnih puteva izazvane trodimenzionalnom organizacijom i kontaktima sa susednim ćelijama (Edmondson et al., 2014;

Mehta et al., 2012; Pinto et al., 2020). Nakon izlaganja rilmenidinu uočene su i promene morfologije prethodno formiranih sferoida, pri čemu je njihov intenzitet zavisio od ćelijske linije. Kod A375 sferoida tretman nije doveo do izraženog smanjenja projektovane površine, već prvenstveno do promena parametara oblika i kompaktnosti, što ukazuje na narušavanje njihove vremenski zavisne morfološke organizacije. Kod 518a2 sferoida efekat je bio manje izražen i ogledao se pre svega u smanjenju pravilnosti spoljašnje konture pri najvišoj koncentraciji rilmenidina. Ovakve promene mogu odražavati poremećaj stabilnosti i organizacije višećelijskog agregata.

U drugoj eksperimentalnoj postavci, rilmenidin je bio prisutan od trenutka zasejavanja ćelija, čime je ispitivan njegov uticaj na sam proces formiranja sferoida. I u ovom sistemu 3D organizacija je smanjila osetljivost ćelija u odnosu na monoslojnu kulturu, ali je stepen promene bio različit između ćelijskih linija: IC_{50} vrednost je kod A375 ćelija bila približno dvostruko veća, dok je kod 518a2 bila približno 5,5 puta viša nego u 2D kulturi. Ova razlika dodatno potvrđuje da odgovor na rilmenidin ne zavisi samo od koncentracije leka već i od bioloških osobina same ćelijske linije i načina njene organizacije u trodimenzionalnom prostoru. Rilmenidin prisutan od trenutka zasejavanja ćelija je narušavao formiranje pravilnih i kompaktnih trodimenzionalnih agregata, pri čemu je efekat postajao izraženiji sa porastom koncentracije. Pri višim koncentracijama struktura agregata bila je rastresitija, a pri 400 μM formiranje kompaktnog sferoida je bilo delimično ili potpuno onemogućeno. Ovakav obrazac može biti posledica kombinovanog uticaja na proliferaciju, agregaciju ćelija i vijabilnost. Međutim, fluorescentno bojenje kalceinom-AM i propidijum-jodidom je pokazalo da poremećaj formiranja sferoida nije bio proporcionalan gubitku vijabilnosti. Pri 100 i 200 μM značajan deo ćelija obe linije zadržavao je kalcein-AM signal uprkos narušenoj organizaciji agregata. Pri 400 μM odgovor se razlikovao između ćelijskih linija: kod A375 ćelija dominirala je PI-pozitivna populacija, dok je kod 518a2 bio očuvan veći udeo vijabilnih pojedinačnih ćelija. Ovi rezultati ukazuju da rilmenidin, pored citotoksičnog dejstva pri višim koncentracijama, može uticati i na procese neophodne za pravilno formiranje i održavanje trodimenzionalne strukture koji uključuju početno grupisanje ćelija, reorganizaciju ćelijsko-ćelijskih i ćelijsko-matriksnih kontakata i kasniji rast, a u tim fazama učestvuju adhezivni molekuli, aktinski citoskelet, mikrotubule i signalizacija povezana sa fokalnim adhezijama (Smyrek et al., 2019). U tom kontekstu je moguće povezati uočene efekte sa nišarinom, imajući u vidu njegovu ulogu u regulaciji integrinskih kontakata i organizacije aktinskog citoskeleta. NISCH se direktno vezuje za citoplazmatski domen α5-podjedinice integrina i inhibira α5β1-integrin-zavisnu migraciju, uz izražene promene organizacije aktinskih filamenata (Alahari et al., 2000; Alahari & Nasrallah, 2004). Pored toga, pokazano je da NISCH utiče na signalizaciju povezanu sa FAK, Rac i PAK, kao i na LIMK-kofilin osu koja ima važnu ulogu u regulaciji dinamike aktinskog citoskeleta (Alahari et al., 2004; Baranwal et al., 2011; Ding et al., 2008). Stoga bi modulacija procesa povezanih sa NISCH mogla doprineti promenama ćelijsko-matriksnih kontakata i citoskeletne organizacije tokom formiranja i održavanja trodimenzionalnih ćelijskih agregata, iako neposredna uloga NISCH u formiranju sferoida do sada nije ispitana.

Uočene morfološke promene sferoida ukazuju da dejstvo rilmenidina nije ograničeno na smanjenje metaboličke aktivnosti. Tome u prilog idu i rezultati mikroskopske analize A375 ćelija nakon 48 h tretmana sa 50 μM rilmenidinom, koja je pokazala smanjenu gustinu ćelijskog monosloja, povećan broj zaobljenih ćelija, kao i povećanje udela ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane. Ipak, populacija mrtvih ćelija je činila nešto više od 8 %, što pokazuje da gubitak integriteta plazma membrane u ovoj vremenskoj tački obuhvata samo manji deo populacije. Rezultati protočne citometrije su potvrdili da tretman rilmenidinom dovodi do apoptoze, ali da odgovor zavisi od koncentracije, vremena tretmana, kao i ćelijske linije. U A375 ćelijama značajan porast aneksin V-pozitivne populacije je registrovan nakon 24 h pri 50 i 100 μM i postao je izraženiji nakon 48 h, dok je u 518a2 ćelijama značajniji odgovor uočen prvenstveno pri 100 μM. Pri četrdesetosmočasovnom tretmanu A375 ćelija rilmenidinom u koncentraciji od 50 μM detektovano je približno 14 % apoptotičnih ćelija, u odnosu na 8 % ćelija obojenih *NucGreen Dead* bojom u mikroskopskom nalazu. Ovakva razlika nije iznenađujuća jer se izlaganje fosfatidilserina, koje omogućava vezivanje aneksina V, javlja ranije od gubitka integriteta membrane koji omogućava ulazak *NucGreen* boje u oštećene ćelije (Vermes et al., 1995). U pojedinačnom eksperimentu nakon

72 h uočena je dodatna promena obrasca ćelijske smrti, sa izraženim smanjenjem aneksin V^-/PI^- vijabilne populacije i porastom aneksin V^-/PI^+ frakcije, naročito pri tretmanu 100 μM rilmenidinom. Ovakav fenotip ukazuje na izraženo narušavanje integriteta plazma membrane i konvencionalno se u aneksin V/PI analizi svrstava u nekrotični obrazac ćelijske smrti. Međutim, savremena klasifikacija ćelijske smrti razlikuje neregulisanu nekrozu od više oblika regulisane ćelijske smrti koji takođe mogu biti praćeni permeabilizacijom plazma membrane i nekrotičnom morfologijom, uključujući nekroptozu, feroptozu i piroptozu (Galluzzi et al., 2018; Hassan & Ahmad, 2026). Kako aneksin V/PI bojenje samo po sebi ne omogućava pouzdano razlikovanje različitih modaliteta ćelijske smrti, za preciznije određivanje mehanizma su potrebne dodatne analize specifičnih molekularnih markera i odgovarajućih signalnih puteva.

Sledeći korak je bio usmeren na analizu ćelijskog ciklusa, kako bi se procenilo da li i usporavanje proliferacije i zastoj ciklusa predstavljaju deo odgovora na rilmenidin. Progresija kroz ćelijski ciklus je kontrolisana delovanjem ciklina, ciklin-zavisnih kinaza i kontrolnih tačaka koje integrišu signale o dostupnosti faktora rasta i hranljivih materija, metaboličkom stanju i integritetu genoma. U uslovima stresa ove kontrolne tačke mogu usporiti ili zaustaviti ciklus, a produženi zastoj može biti praćen senescencijom ili ćelijskom smrću (Malumbres & Barbacid, 2009; H. K. Matthews et al., 2022). Rezultati pokazuju da rilmenidin izaziva koncentracijski i vremenski zavisnu preraspodelu ćelija melanoma između pojedinih faza ćelijskog ciklusa. Pri nižim koncentracijama i u ranijim vremenskim tačkama uočena je tendencija zadržavanja ćelija u G_0/G_1 fazi, dok je pri višim koncentracijama i nakon dužeg tretmana dominirala njihova akumulacija u G_2/M fazi. S obzirom na to da su ispitivane populacije bile asinhrone, moguće je da su se ćelije u trenutku dodavanja rilmenidina nalazile u različitim fazama ciklusa, te ovakav prelaz ne mora ukazivati na postojanje dva različita citostatska mehanizma: ćelije koje još nisu prošle G_1 restrikcionu tačku mogle su da se zadrže u G_0/G_1, dok su one koje su već započele replikaciju DNK mogle da nastave prolazak kroz S fazu i da se naknadno akumuliraju u G_2 ili mitozi (Bertoli et al., 2013). Nakon 24 h tretmana najvišom koncentracijom rilmenidina, u A375 ćelijama je došlo do povećanog nakupljanja u G_2/M fazi. Nakon 48 h isti obrazac bio je prisutan već pri koncentraciji od 50 μM, a dodatno izražen pri 100 μM. Promene raspodele ćelija kroz ciklus nakon tretmana rilmenidinom prethodno su opisane i u K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije, u kojima je zabeležena akumulacija ćelija u S i G_2/M fazi (Srdic-Rajic et al., 2016). Pri nižim koncentracijama rilmenidina promene raspodele ćelija po fazama ciklusa bile su izraženije od indukcije apoptoze, dok je sa povećanjem koncentracije i produžavanjem tretmana akumulacija A375 ćelija u G_2/M bila je praćena povećanjem udela aneksin V-pozitivnih ćelija. Ovakav vremenski sled odgovara kombinovanom citostatskom i citotoksičnom delovanju: pri nižim koncentracijama i ranijim vremenskim tačkama izraženije su promene proliferativnog ponašanja, dok sa porastom koncentracije i produženjem tretmana raste apoptotska i kasnije membransko-citotoksična komponenta. Moguće je i da produženo zadržavanje ćelija u G_2/M fazi doprinosi aktiviranju apoptotskog odgovora kada ćelije ne uspeju da ponovo uspostave uslove potrebne za nastavak ciklusa, te zastoj ciklusa i apoptoza predstavljaju sukcesivne događaje, ali i paralelne odgovore na isti ćelijski stres. Manje izražen odgovor 518a2 ćelija bio je saglasan sa njihovom manjom apoptotskom osetljivošću na rilmenidin. Značajna G_2/M akumulacija u ovoj liniji utvrđena je tek nakon 48 h tretmana koncentracijom od 100 μM, dok niže koncentracije nisu značajno menjale raspodelu ćelija po fazama ciklusa. Sličan obrazac uočen je i u analizi apoptoze, u kojoj je značajno povećanje aneksin V^+ populacije 518a2 ćelija registrovano prvenstveno pri najvišoj koncentraciji. Udeo ćelija u sub-G_1 regionu kod obe ćelijske linije je ostao relativno nizak i nije se statistički značajno razlikovao od kontrole, iako je pri najvišim koncentracijama postojala tendencija njegovog povećanja. Sub-G_1, odnosno hipodiploidna populacija, nastaje kada se tokom kasnijih faza apoptoze izgube fragmenti DNK, zbog čega se u ćeliji detektuje manji sadržaj DNK od onog karakterističnog za G_0/G_1 populaciju (Kajstura et al., 2007). Odsustvo značajne sub-G_1 akumulacije nije u suprotnosti sa povećanjem udela aneksin V^+ ćelija, jer se izlaganje fosfatidilserina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane javlja ranije tokom apoptoze, dok nastanak detektabilne hipodiploidne populacije zahteva izraženiju fragmentaciju i gubitak DNK (Vermes et al., 1995). To

može značiti da je u ispitivanim vremenskim tačkama veći deo apoptotskih ćelija jednostavno detektovan pre razvoja izražene degradacije DNK.

Literaturni podaci pokazuju da je u ćelijama karcinoma ovarijuma povećana ekspresija NISCH izazvala G_1 zastoj, uz smanjenje nivoa ciklina D1 i CDK4, dok je utišavanje NISCH ubrzalo progresiju ćelijskog ciklusa i povećalo ekspresiju ovih regulatora (J. Li et al., 2015). Sličan efekat opisan je u ćelijama karcinoma dojke, gde je ekspresija NISCH povećala udeo ćelija u G1 fazi i smanjila nivo ciklina D1 (Maziveyi et al., 2019). Pored toga, pokazano je da NISCH funkcijski sarađuje sa LKB1 u ograničavanju proliferacije preko ose ciklin D1-CDK4, pri čemu je gubitak oba proteina bio praćen povećanjem udela ćelija u S fazi (Jain et al., 2013). Ovi rezultati podržavaju mogućnost da NISCH učestvuje u regulaciji proliferativnog odgovora i da zabeleženi efekti rilmenidina na ćelijama melanoma mogu nastati njegovom agonističkom stimulacijom.

Pored efekata na ćelijski ciklus i apoptozu, rilmenidin je značajno uticao i na procese koji određuju interakciju ćelija melanoma sa njihovim mikrookruženjem. Ćelijska adhezija za ekstracelularni matriks i njena dinamička regulacija neophodne su za migraciju i invaziju tumorskih ćelija, pri čemu integrini i fokalne adhezije omogućavaju povezivanje ekstracelularnog matriksa sa aktinskim citoskeletom i prenos mehaničkih i signalnih informacija neophodnih za kretanje ćelije (Burridge, 2017; Hynes, 2002). NISCH je upravo sa ovim procesima funkcijski povezan. Prethodno je pokazano da njegova ekspresija menja sastav fokalnih adhezija, smanjuje vezivanje tumorskih ćelija za ekstracelularni matriks i ograničava formiranje invadopodija i degradaciju matriksa (Maziveyi et al., 2018). Rezultati ove disertacije su pokazali da rilmenidin utiče kako na uspostavljanje novih adhezivnih kontakata, tako i na stabilnost već formiranih kontakata sa podlogom. Kada je lek bio prisutan tokom procesa vezivanja ćelija, smanjen je procenat adherentnih ćelija obe ispitivane linije, pri čemu se efekat ranije i jače ispoljavao kod A375 ćelija. Još izraženija promena uočena je kod prethodno adherentnih ćelija, gde je tretman rilmenidinom doveo do njihovog progresivnog odvajanja od podloge tokom 24 h. Budući da je znatan deo odvojenih ćelija zadržao vijabilnost, odvajanje od podloge nije moguće pripisati isključivo ćelijskoj smrti, već nalaz ukazuje na poremećaj mehanizama neophodnih za održavanje stabilne adhezije. Sličan efekat je prethodno opisan u ćelijama duktalnog adenokarcinoma pankreasa, kod kojih je rilmenidin smanjivao vezivanje i širenje ćelija na različitim supstratima ekstracelularnog matriksa, uključujući kolagen I i fibronektin (Živić et al., 2026). Poremećaj adhezije može doprineti i objašnjenju drugih fenotipskih promena uočenih u ovom istraživanju. Zaobljavanje i odvajanje A375 ćelija od podloge nakon 48 h tretmana 50 μM rilmenidinom, kao i smanjenje kompaktnosti i rastresitija organizacija tumorskih sferoida, mogu predstavljati različite manifestacije narušenih ćelijsko-matriksnih i ćelijsko-ćelijskih interakcija. Iako takve morfološke promene mogu pratiti apoptozu, one mogu prethoditi ćelijskoj smrti i nastati kao posledica promenjenih adhezivnih svojstava ćelija. Gubitak odgovarajućeg kontakta sa ekstracelularnim matriksom prekida integrin-zavisne signale preživljavanja i može aktivirati anoikis, oblik programirane ćelijske smrti izazvan odvajanjem ćelije od matriksa (Gilmore, 2005; Paoli et al., 2013). Međutim, ćelije melanoma mogu razviti otpornost na anoikis i određeno vreme preživeti u suspenziji, što predstavlja važnu osobinu povezanu sa njihovom sposobnošću diseminacije (Koltai & Fliegel, 2026). Činjenica da je znatan deo odvojenih ćelija i dalje isključivao tripan-plavo pokazuje da odvajanje od podloge i ćelijska smrt nisu istovremeni događaji. Ipak, niža vijabilnost odvojene frakcije u odnosu na odgovarajuću kontrolu ukazuje da destabilizacija adhezije može povećati verovatnoću naknadnog gubitka integriteta membrane i indukcije anoikisa.

Pored poremećaja adhezije, uočeno je i smanjenje migratornog potencijala ćelija melanoma pod tretmanom rilmenidinom. Koncentracije od 10 i 25 μM su usporile zatvaranje rane kod A375 ćelija, dok je kod manje osetljive linije 518a2 značajan efekat uglavnom registrovan pri 25 μM. Korišćene koncentracije bile su niže od onih pri kojima su u prethodnim analizama uočene izražene promene ćelijskog ciklusa i apoptoze, a antimigratorni efekat potvrđen je i *transwell* esejem. Zajedno, ovi rezultati podržavaju postojanje izražene antimigratorne komponente dejstva rilmenidina i saglasni su sa ranijim dokazima da NISCH ograničava migraciju preko α5β1-integrina i Rac1/PAK1/LIMK1/kofilin ose (Alahari, 2003; Alahari et al., 2000, 2004; Ding et al., 2008). Mogućnost uključivanja ovog signalnog mehanizma u dejstvo rilmenidina dodatno podržavaju

rezultati iz modela duktalnog adenokarcinoma pankreasa, u kojima je rilmenidin inhibirao migraciju, dok je u PANC-1 ćelijama istovremeno smanjen nivo aktivnog, GTP-vezanog Rac1 (Živić et al., 2026).

Nasuprot jasnom smanjenju dvodimenzionalne i bazalne hemotaktičke migracije, efekat rilmenidina na invaziju zavisio je od vrste matriksa. Ovakav nalaz je u skladu sa činjenicom da kretanje po ravnoj površini i prolazak kroz trodimenzionalnu prepreku zahtevaju delimično različite mehanizme ćelijske pokretljivosti, uključujući reorganizaciju citoskeleta, ćelijsko-matriksnu adheziju, kontraktilnost i remodelovanje matriksa (Friedl & Wolf, 2010). Nakon tretmana rilmenidinom prolazak A375 ćelija kroz BME smanjen je na približno 64 % kontrolne vrednosti, dok je bazalna migracija istovremeno smanjena na oko 60 %, zbog čega je relativni indeks invazivnosti ostao blizu 1. To ukazuje da je smanjenje prolaska kroz BME uglavnom pratilo opšti antimigratorni efekat tretmana, bez dodatnog izraženog inhibitornog dejstva na sposobnost prolaska kroz ovaj matriks. Nasuprot tome, broj ćelija koje su prošle kroz kolagen tipa I ostao je gotovo nepromenjen uprkos smanjenoj bazalnoj migraciji, pa je relativni indeks invazivnosti iznosio približno 1,58. Ovaj rezultat ne ukazuje na povećanje apsolutne invazije, već na relativno očuvanu sposobnost prolaska kroz kolagenski matriks. Rezultati stoga ukazuju na matriks-zavisan odgovor A375 ćelija na rilmenidin, a ne na uniformnu promenu invazivnog potencijala. Slična razlika u intenzitetu antimigratornog i antiinvazivnog efekta je opisana i u ćelijama duktalnog adenokarcinoma pankreasa, gde je rilmenidin jasno smanjivao adheziju i migraciju, dok je prolazak ćelija kroz kolagen tipa I, fibronektin ili ekstrakt bazalne membrane bio samo umereno smanjen i uglavnom nije dostizao statističku značajnost (Živić et al., 2026). Takva razlika može se posmatrati u kontekstu fenotipske plastičnosti tumorskih ćelija i njihove sposobnosti da u trodimenzionalnom matriksu koriste različite modalitete kretanja. Mezenhimski tip migracije u većoj meri zavisi od integrinske adhezije i proteolitičkog remodelovanja matriksa, dok ameboidno kretanje može biti manje zavisno od stabilnih adhezivnih kontakata i aktivnosti matriksnih metaloproteinaza (MMP). Stoga smanjenje stabilnosti adhezije izazvano rilmenidinom ne mora nužno u istoj meri ograničiti prolazak ćelija kroz trodimenzionalni matriks ukoliko ćelije mogu koristiti alternativne mehanizme kretanja. U prilog očuvanju proteolitičke komponente invazije u drugom tumorskom modelu ide i nalaz da je rilmenidin u ćelijama duktalnog adenokarcinoma pankreasa samo blago smanjivao gelatinolitičku aktivnost (Živić et al., 2026).

Različit odgovor A375 ćelija u BME i kolagenu tipa I može dodatno odražavati razlike u sastavu i fizičkim osobinama ova dva matriksa. BME predstavlja složen ekstrakt bogat lamininom i kolagenom tipa IV i koristi se kao model bazalne membrane, dok kolagen tipa I predstavlja glavni fibrilarni protein intersticijalnog i dermalnog matriksa kroz koji se ćelije melanoma kreću nakon prolaska kroz bazalnu membranu (Benton et al., 2014). Prolazak kroz ova dva matriksa zato može zahtevati različite receptore, proteaze i mehaničke strategije migracije. Tome može doprineti i činjenica da invazija zahteva optimalnu jačinu ćelijsko-matriksne adhezije: previše stabilni kontakti mogu ograničiti kretanje, dok preslabi kontakti ne omogućavaju stvaranje dovoljne vučne sile (Palecek et al., 1997). Promenjena dinamika adhezija bi stoga mogla istovremeno olakšati odvajanje ćelija od podloge i omogućiti njihovo prilagođavanje kretanju kroz određene tipove matriksa.

Ovakvo tumačenje je posebno relevantno za melanom, čije ćelije pokazuju izraženu migratornu plastičnost i mogu prelaziti između adhezivnijeg, proteolitički zavisnog mezenhimskog i zaobljenijeg, kontraktilnog ameboidnog načina kretanja u zavisnosti od strukture i mehaničkih osobina matriksa. Ova osobina je dokumentovana i u modelima izvedenim iz linije A375, u kojima ćelije u trodimenzionalnom kolagenskom matriksu mogu usvojiti zaobljenu, ameboidnu morfologiju (Taddei et al., 2014). U ovom kontekstu, kombinacija smanjene adhezije i slabije 2D migracije uz očuvanu sposobnost prolaska kroz kolagen može biti saglasna sa prilagođavanjem načina kretanja uslovima trodimenzionalnog matriksa, mada takva fenotipska tranzicija u ovom istraživanju nije direktno ispitivana. Širi okvir za tumačenje predstavlja i fenotipsko prebacivanje između proliferativnog i invazivnog stanja, dobro opisano u melanomu (Hoek et al., 2008). Ferguson i saradnici su pokazali da inhibicija MEK smanjuje proliferaciju ćelija melanoma, uključujući A375, ali istovremeno može povećati njihovu invaziju kroz trodimenzionalni kolagen, uz učešće

nereceptorske tirozin-kinaze SRC i povećanu ekspresiju MMP2 i MMP14 (Ferguson et al., 2013). Ovaj rad podržava mogućnost da antiproliferativni pritisak u melanomu može biti praćen uključivanjem programa koji doprinose očuvanju ili povećanju invazivnog potencijala ćelija. U tom kontekstu su zanimljivi i rezultati RNK-sekvenciranja u ovom istraživanju, gde je nakon 48 h tretmana rilmenidinom u A375 ćelijama uočena povećana ekspresija gena uključenih u integrinsku signalizaciju i fokalne adhezije (*ITGA5, PXN, TLN1*), remodelovanje aktinskog citoskeleta i invazivne strukture (*ACTN4* – aktinin 4; *CTTN* – kortaktin; *SH3PXD2A* – supstrat tirozinske kinaze sa 5 SH3 domena, TKS5), kao i signalizaciju i proteolitičko remodelovanje ekstracelularnog matriksa (*SRC, FYN, MMP14* i *MMP2*). Budući da transkriptomska analiza i invazioni esej nisu izvedeni u istoj vremenskoj tački, ovi rezultati se ne mogu direktno uzročno povezati**,** ali njihov smer podržava mogućnost da rilmenidin istovremeno smanjuje opštu migratornu aktivnost i očuva ili indukuje određene mehanizme prilagođavanja trodimenzionalnom matriksu.

Ipak, očuvana sposobnost prolaska kroz matriks *in vitro* ne mora nužno odražavati ukupan metastatski potencijal tumorskih ćelija. U modelu duktalnog adenokarcinoma pankreasa rilmenidin je, uprkos samo skromnom efektu na invaziju kroz matriks *in vitro*, u PANC-1 ksenograft modelu zebrice značajno smanjio metastatsku diseminaciju, uključujući broj metastatskih žarišta i udeo embriona sa metastazama (Živić et al., 2026). Ovaj nalaz pokazuje da pojedine faze metastatske kaskade ne moraju jednako reagovati na tretman. Smanjena adhezija i migracija zato mogu doprineti ukupnom antimetastatskom efektu čak i kada sposobnost prolaska kroz određeni tip matriksa ostaje relativno očuvana. Rezultat pojedinačnog invazionog eseja stoga ne treba izjednačavati sa ukupnim metastatskim potencijalom, koji zavisi od niza uzastopnih procesa, uključujući migraciju, intravazaciju, preživljavanje u cirkulaciji, vezivanje za endotel, ekstravazaciju i kolonizaciju udaljenih tkiva (Lambert et al., 2017).

Transkriptomska analiza A375 ćelija nakon tretmana rilmenidinom je pružila eksplorativni uvid u molekularne promene koje mogu pratiti uočene funkcionalne efekte. GSEA analiza obogaćenosti genskih skupova je ukazala na izraženu vremensku zavisnost odgovora, pri čemu su najizraženije promene obuhvatale programe povezane sa ćelijskim ciklusom, translacijom, energetskim metabolizmom, citoskeletom i interakcijama sa ekstracelularnim matriksom. Jedan od najuočljivijih nalaza odnosio se na ćelijski ciklus. Nakon 24 h pozitivno su bili obogaćeni programi povezani sa G_2/M kontrolnom tačkom, E2F-zavisnom transkripcijom, mitotskim vretenom i mitotskim ciklusom, dok su nakon 48 h isti ili funkcijski srodni programi pokazali negativno obogaćenje. Pozitivno obogaćenje programa G_2/M kontrolne tačke posle 24 h tretmana može biti povezano sa aktivacijom regulatornih mehanizama koji proveravaju spremnost ćelije za ulazak u mitozu i, u prisustvu ćelijskog stresa ili neadekvatnih uslova za napredovanje ciklusa, odlažu njegovu dalju progresiju. Ovakav nalaz je u skladu sa akumulacijom ćelija u G_2/M fazi uočenom protočnom citometrijom. Nasuprot tome, negativno obogaćenje mitotskih i proliferativnih programa nakon 48 h, uz zadržavanje povećanog udela ćelija u G_2/M fazi i izraženiji apoptotski odgovor, ukazuje na smanjenu aktivnost transkripcionih programa neophodnih za dalju progresiju kroz mitozu (M. Fischer & Müller, 2017). Negativno obogaćenje programa povezanih sa oksidativnom fosforilacijom, metabolizmom masnih kiselina, translacijom i ribozomskom funkcijom ukazuje i na promene energetskih i biosintetskih procesa. Kako melanom odlikuje izražena metabolička plastičnost, koja omogućava prilagođavanje promenama dostupnosti nutrijenata, kiseonika i drugim oblicima ćelijskog stresa (Avagliano et al., 2020), posebno je interesantan dosledan nalaz negativnog obogaćenja programa translacije, njene inicijacije i elongacije i obrade ribozomske RNK u obe vremenske tačke. Smanjenje sinteze proteina predstavlja poznatu adaptaciju na ćelijski stres kojom se ograničavaju energetski zahtevni biosintetski procesi (Pakos-Zebrucka et al., 2016), a slične promene opisane su i nakon gubitka kontakta ćelija sa ekstracelularnim matriksom (Ng et al., 2012).

Druga važna grupa promena odnosila se na citoskelet, adheziju i interakcije sa ekstracelularnim matriksom. Nakon 24 h pozitivno je bio obogaćen program *Rho GTPase Cycle*, dok su nakon 48 h izraženije bile promene programa povezanih sa organizacijom ekstracelularnog matriksa, kolagenom i ćelijskim kontaktima. Rho GTPaze učestvuju u regulaciji aktinskog citoskeleta, fokalnih adhezija, ćelijske morfologije i migracije, pa rano obogaćenje ovog programa

može biti povezano sa promenama adhezije uočenim tokom prvih sati tretmana (Jung et al., 2020). Nakon 48 h povećana je i ekspresija više gena uključenih u ćelijsko-matriksne kontakte i remodelovanje matriksa, uključujući *ITGA5, PXN, TLN1, MMP14* i *MMP2*. Ovaj obrazac je posebno interesantan u odnosu na funkcionalne rezultate, prema kojima je rilmenidin smanjivao adheziju i 2D migraciju A375 ćelija, dok invazija kroz kolagen tipa I nije bila proporcionalno smanjena. Matriksna metaloproteinaza 14 (MMP14), poznata i kao membranska matriksna metaloproteinaza tipa 1 (eng. *membrane-type 1 matrix metalloproteinase*, MT1-MMP), ima važnu ulogu u degradaciji fibrilarnog kolagena i može aktivirati pro-MMP2, čime olakšava prolazak tumorskih ćelija kroz ekstracelularni matriks (Castro-Castro et al., 2016; Poincioux et al., 2009). U ovom kontekstu zanimljive su i vremenski zavisne promene programa povezanog sa mTORC1 signalizacijom. Genski skup *Hallmark mTORC1 Signaling* bio je pozitivno obogaćen nakon 24 h, a negativno nakon 48 h. mTORC1 predstavlja centralni regulator anaboličkih i kataboličkih procesa i povezuje dostupnost nutrijenata, faktore rasta i energetsko stanje ćelije sa sintezom proteina, metabolizmom i autofagijom (Saxton & Sabatini, 2017). Negativno obogaćenje ovog programa nakon 48 h uklapa se sa istovremenim negativnim obogaćenjem translacionih i drugih biosintetskih programa. Promene mTORC1-povezanog programa mogu se razmatrati i u kontekstu izraženog smanjenja adhezije izazvanog rilmenidinom. Gubitak kontakta sa ekstracelularnim matriksom predstavlja mehanički i metabolički stres i može biti praćen promenama mTORC1 signalizacije, proteinske sinteze i autofagije (Avivar-Valderas et al., 2013; Ng et al., 2012). Avivar-Valderas i saradnici su pokazali da odvajanje ćelija od matriksa može aktivirati kinazu sličnu protein-kinazi R u endoplazmatičnom retikulumu (eng. *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*, PERK) i AMPK, smanjiti mTORC1–p70S6K signalizaciju (p70S6K – ribozomska protein-kinaza S6 od 70 kDa) i podstaći autofagiju. Slično tome, Zhang i saradnici su pokazali da integrinska signalizacija u odgovoru na krutost matriksa podstiče aktivaciju mTORC1 i anaboličke procese, dok odvajanje ćelija od matriksa smanjuje aktivnost ove ose i povećava autofagiju povezanu sa otpornošću na anoikis (Avivar-Valderas et al., 2013; C. Zhang et al., 2024). S obzirom na to da rilmenidin u A375 ćelijama dovodi do vremenski zavisnog smanjenja adhezije, moguće je da deo kasnijih promena metaboličkih, translacionih i mTORC1-povezanih programa predstavlja odgovor na promenjeno adhezivno stanje ćelija, pored mogućeg direktnog efekta leka.

Sa ovim rezultatima može se povezati i moguća uključenost autofagije. Genski skup *REACTOME_AUTOPHAGY* nakon 24 h pokazao je pozitivno obogaćenje (NES = 1,38), ali bez dostizanja statističke značajnosti. Rilmenidin je u drugim eksperimentalnim sistemima opisan kao induktor mTOR-nezavisne autofagije (Perera et al., 2018, 2021; Williams et al., 2008), a u *nematodi Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) je pokazano da je autofagija neophodna za efekat rilmenidina na produženje životnog veka, kao i da taj odgovor zavisi od *nish-1*, ortologa humanog *NISCH*. U istoj studiji smanjenje funkcije TOR kompleksa 1 (TORC1) ili primena rapamicina nisu dodatno pojačavali efekat rilmenidina, što ukazuje na funkcijsko preplitanje ovih stresno-metaboličkih puteva (Bennett et al., 2023). Ipak, odnos između rilmenidina, mTORC1 i autofagije verovatno je izrazito zavisan od ćelijskog konteksta. Činjenica da je rilmenidin u nekim sistemima indukovao autofagiju nezavisno od mTOR-a, dok je odvajanje od matriksa u drugim modelima podsticalo autofagiju upravo preko inhibicije mTORC1, ukazuje da se ova dva mehanizma međusobno ne isključuju. U A375 ćelijama mogla bi postojati kombinacija direktnog odgovora na rilmenidin i sekundarne adaptacije izazvane promenama adhezije i metaboličkog stanja. Međutim, za konačan zaključak da li je autofagni fluks zaista promenjen i kakvu bi funkcionalnu ulogu eventualna autofagija imala u A375 ćelijama potrebna je dodatna funkcionalna analiza.

5.3. Translacioni potencijal rilmenidina i ograničenja njegove prenamene

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da rilmenidin u ćelijama melanoma izaziva promene više funkcijski relevantnih procesa, uključujući proliferaciju, adheziju, migraciju i metaboličko stanje, uz nalaze kompatibilne sa modulacijom autofagijskog odgovora. S obzirom na širinu uočenih efekata,

rilmenidin je zanimljiv kandidat za dalje ispitivanje u okviru farmakološke prenamene u onkologiji. Ipak, eventualni translacioni značaj ovih nalaza treba razmatrati u kontekstu biološke heterogenosti melanoma. U analiziranim kohortama viša ekspresija *NISCH* je bila povezana sa povoljnijim ishodom kod žena, dok je kod muškaraca uočen suprotan prognostički obrazac. Polno specifična prognostička vrednost ekspresije *NISCH* ukazuje na biološku heterogenost NISCH-povezane signalizacije u melanomu, ali ne omogućava zaključak o prediktivnoj vrednosti ovog markera za odgovor na rilmenidin. Zbog toga bi eventualna translacija rilmenidina zahtevala dodatna istraživanja koja bi trebalo da utvrde da li nivo ekspresije *NISCH*, samostalno ili u kombinaciji sa drugim molekularnim i kliničkim karakteristikama tumora, može predvideti osetljivost na rilmenidin.

Takođe, pokazana aktivnost rilmenidina u ćelijskim modelima pruža osnovu za dalje pretkliničko ispitivanje njegovog antitumorskog potencijala, ali ne omogućava neposredno zaključivanje o kliničkoj efikasnosti. Jedno od ključnih translacionih pitanja odnosi se na farmakološku ostvarivost koncentracija potrebnih za antitumorski efekat. Prenamena registrovanog leka u tom pogledu ima praktične prednosti, jer su osnovni farmakokinetički i bezbednosni podaci, proizvodni proces i iskustvo primene kod ljudi već poznati (Pushpakom et al., 2019). Ipak, koncentracije koje su u ovom istraživanju bile potrebne za izražen antitumorski efekat nalaze se u mikromolarnom opsegu. U terapiji hipertenzije, rilmenidin se primenjuje u dnevnoj dozi od 1 mg, uz mogućnost povećanja do 3 mg/dan, pri čemu koncentracije u plazmi dostižu nivo od 10 ng/mL (Dollery et al., 1988). Ovi podaci ukazuju na značajan jaz između izloženosti ostvarene pri standardnoj antihipertenzivnoj primeni i koncentracija koje su pokazale antitumorsku aktivnost *in vitro*. Međutim, optimalna doza rilmenidina za eventualnu primenu u onkologiji nije poznata i ne mora odgovarati dozama utvrđenim za antihipertenzivnu indikaciju. U eksperimentalnom mišjem modelu amiotrofične lateralne skleroze rilmenidin je primenjivan intraperitonealno u dozi od 10 mg/kg četiri puta nedeljno (Perera et al., 2021). Preračunavanje prema standardnoj aproksimaciji zasnovanoj na telesnoj površini daje humanu ekvivalentnu dozu od približno 0,81 mg/kg, odnosno oko 57 mg za osobu telesne mase 70 kg (Nair & Jacob, 2016). Ovakva ekstrapolacija pokazuje da su u eksperimentalnim sistemima ostvarene znatno veće sistemske izloženosti od onih koje odgovaraju standardnom antihipertenzivnom doziranju bez ispoljavanja izražene toksičnosti. Stoga bi pre razmatranja kliničke primene rilmenidina za lečenje malignih bolesti bilo neophodno detaljno ispitati farmakokinetiku, odnos ekspozicije i efekta i granice podnošljivosti pri dozama relevantnim za antitumorsko delovanje. Ovo je posebno relevantno imajući u vidu da se pri razvoju antikancerskih lekova prihvatljiv odnos koristi i rizika razlikuje od onog kod dugotrajne terapije benignih hroničnih bolesti, pri čemu se maksimalno podnošljiva ili optimalna biološka doza određuje neposredno u onkološkoj populaciji uz praćenje dozno ograničavajućih neželjenih efekata.

Dodatnu mogućnost predstavlja farmakološka optimizacija osnovnog jedinjenja. Vučićević i saradnici su identifikovali derivat rilmenidina sa većom selektivnošću prema I_1-imidazolinskim receptorima i citotoksičnim profilom sličnim matičnom jedinjenju, koji je istovremeno značajno pojačavao apoptotski odgovor na doksorubicin u K562 ćelijskom modelu (Vucicevic et al., 2016). Ovakvi rezultati ukazuju da bi povećanje potentnosti, racionalne kombinacije sa drugim antitumorskim lekovima ili razvoj odgovarajućih formulacija mogli predstavljati načine za prevazilaženje ograničenja povezanih sa koncentracijama potrebnim za efekat *in vitro*. Rezultate ovog istraživanja zato treba posmatrati prvenstveno kao dokaz biološkog principa koji opravdava dalje pretkliničko ispitivanje rilmenidina i njegovih derivata. Pre eventualne translacije potrebno je utvrditi farmakološki dostižne slobodne koncentracije leka u plazmi i tumorskom tkivu, odnos ekspozicije i antitumorskog efekta, bezbednosni profil pri relevantnim dozama, kao i mogućnost pojačavanja dejstva racionalnim kombinacijama ili farmakološkom optimizacijom.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih analiza, ova disertacija je omogućila sagledavanje uloge nišarina u biologiji melanoma, kao i procenu antitumorskog potencijala agonista imidazolinskih I_1-receptora u modelima humanih ćelija melanoma *in vitro*. Istraživanje je obuhvatilo analizu ekspresije i prognostičkog značaja NISCH u melanomu, ispitivanje njegove povezanosti sa molekularnim procesima relevantnim za progresiju bolesti, kao i procenu efekata farmakološke modulacije imidazolinskog I_1-receptorskog sistema na proliferaciju, preživljavanje, migraciju, invazivnost, adheziju i signalne puteve tumorskih ćelija. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da:

1. Ekspresija NISCH je smanjena u melanomu u odnosu na normalnu kožu i nevuse, ali nije uočeno dalje smanjenje njegovih nivoa tokom progresije bolesti. Niži nivoi u uzorcima melanoma u odnosu na normalnu kožu su uočeni i kod svih analiziranih protein-kodirajućih transkripata, što ukazuje na opšte smanjenje transkripcione aktivnosti *NISCH* gena.

2. U melanomu je uočena do sada neopisana subćelijska raspodela nišarina, sa izraženim perinukleusnim i nukleusnim signalom u tumorskim uzorcima pacijenata i A375 ćelijama. Ovaj nalaz ukazuje da, pored smanjene ekspresije, promena subćelijske lokalizacije može predstavljati dodatni nivo regulacije funkcije nišarina u melanomu, ali i otvara novo pitanje o njegovoj mogućoj ulozi u nukleusu.

3. Genetičke i epigenetičke promene mogu doprineti smanjenoj ekspresiji NISCH u melanomu. Mikrodelecije gena *NISCH* su bile povezane sa nižim nivoom transkripta, a često je detektovana i hipermetilacija promotorskog regiona ovog gena, naročito u metastatskim uzorcima.

4. Prognostički značaj ekspresije *NISCH* u melanomu pokazuje polno specifičan obrazac. Viša ekspresija *NISCH* bila je povezana sa povoljnijim ishodom kod žena, dok je kod muškaraca uočen suprotan prognostički obrazac, iako se ukupni nivoi ekspresije NISCH nisu značajno razlikovali između polova. Ovaj nalaz ukazuje na polno specifičan biološki kontekst delovanja nišarina u melanomu i na to da prethodno opisanu tumor-supresorsku ulogu nišarina nije opravdano posmatrati kao univerzalnu. Takođe pruža osnovu za detaljno ispitivanje njegovog prognostičkog značaja i u drugim malignitetima, uz razmatranje pola kao biološke varijable.

5. Ekspresija NISCH povezana je sa različitim metaboličkim, proliferativnim i signalnim programima melanoma. Kod oba pola viša ekspresija *NISCH* bila je povezana sa negativnim obogaćenjem programa mTORC1 signalizacije i više puteva energetskog metabolizma, dok su pojedini programi, uključujući WNT signalizaciju i puteve povezane sa održavanjem genomske stabilnosti, pokazivali polno specifične obrasce.

6. Od ispitivanih agonista imidazolinskih I_1-receptora, rilmenidin je imao najizraženije antiproliferativno dejstvo, a uz to je pokazao i selektivnost za ćelije melanoma u odnosu na netumorske ćelije kože. A375 ćelije, sa najvišom ekspresijom NISCH, bile su najosetljivije na tretman, dok vemurafenib-rezistentne A375R ćelije sa izrazito niskom ekspresijom NISCH nisu pokazale značajan odgovor na rilmenidin.

7. Trodimenzionalna organizacija ćelija smanjuje njihovu osetljivost na rilmenidin. A375 i 518a2 sferoidi zahtevali su više koncentracije leka nego odgovarajuće monoslojne kulture, dok je rilmenidin istovremeno narušavao formiranje, kompaktnost i stabilnost sferoida, što ukazuje na dejstvo na procese proliferacije i organizacije ćelijskih kontakata.

8. Rilmenidin izaziva vremenski i koncentracijski zavisne promene ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti. Pri nižim koncentracijama i ranijim vremenskim tačkama izraženije su promene u raspodeli ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, dok sa povećanjem koncentracije i produženjem tretmana dolazi do akumulacije ćelija u G2/M kompartmentu i povećanja apoptotske i citotoksične komponente.

9. Rilmenidin remeti adhezivna svojstva ćelija melanoma i smanjuje njihov migratorni potencijal. Tretman je otežavao uspostavljanje novih adhezivnih kontakata, destabilizovao već formirane kontakte sa podlogom i smanjivao migraciju u testu zatvaranja rane i *transwell* esejima.

10. Efekat rilmenidina na invazivnost A375 ćelija zavisi od sastava ekstracelularnog matriksa. Prolazak kroz BME smanjen je približno proporcionalno smanjenju bazalne migracije, dok je sposobnost prolaska kroz kolagen tipa I relativno očuvana uprkos značajno smanjenoj bazalnoj pokretljivosti. Ovi rezultati ukazuju na matriks-zavisan odgovor i moguću plastičnost načina kretanja ćelija.

11. Transkriptomski odgovor A375 ćelija na rilmenidin je bio vremenski zavisan i obuhvatao je reorganizaciju programa povezanih sa proliferacijom, ćelijskim ciklusom, translacijom, energetskim metabolizmom, citoskeletom, ćelijskim kontaktima i ekstracelularnim matriksom, pri čemu su nakon 48 h posebno izražene promene ukazivale na smanjenje proliferativnih i biosintetskih programa i remodelovanje procesa povezanih sa ćelijskom pokretljivošću i interakcijama sa matriksom. Ovakav obrazac je u skladu sa funkcijskim rezultatima smanjene proliferacije, promenjene raspodele ćelija u ćelijskom ciklusu, indukcije apoptoze, narušene adhezije i formiranja sferoida, smanjene 2D migracije i različitog ponašanja ćelija u zavisnosti od sastava ekstracelularnog matriksa.

Ograničenja ove studije uključuju relativno malu kohortu tumorskih uzoraka iz jednog zdravstvenog centra, zbog čega je neophodna potvrda dobijenih nalaza u većim nezavisnim kohortama. Budući da je većina funkcionalnih eksperimenata sprovedena u ćelijskim modelima, neposredna uloga nišarina u odgovoru na rilmenidin, značaj njegove nukleusne lokalizacije i mehanizmi polno specifičnih razlika ostaju otvorena pitanja za buduća istraživanja u *in vivo* modelima. Terapijski potencijal rilmenidina zahteva dalju mehanističku i pretkliničku validaciju, posebno u pogledu zavisnosti efekata od nišarina i potvrde u *in vivo* modelima. Takođe treba razmotriti i moguće razlike u odgovoru na tretman u zavisnosti od pola, kao i farmakološku ostvarivost koncentracija koje su pokazale aktivnost *in vitro*.

Zaključno, najveći doprinos ovog rada jeste prikaz NISCH kao potencijalnog biomarkera i farmakološki relevantnog regulatora čiji značaj u melanomu zavisi od biološkog konteksta. Dobijeni rezultati otvaraju nova pitanja i pružaju osnovu za dalje ispitivanje nišarina u biologiji melanoma i rilmenidina kao kandidata za farmakološku prenamenu u onkologiji.

7. LITERATURA

Adeshakin, F. O., Adeshakin, A. O., Afolabi, L. O., Yan, D., Zhang, G., & Wan, X. (2021). Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming. *Frontiers in Oncology*, *11*, 626577. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626577

Akbani, R., Akdemir, K. C., Aksoy, B. A., Albert, M., Ally, A., Amin, S. B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J. T., Ayala, B., Baboud, J., Balasundaram, M., Balu, S., Barnabas, N., Bartlett, J., Bartlett, P., Bastian, B. C., Baylin, S. B., Behera, M., … Zou, L. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, *161*(7), 1681. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044

Akodad, S., Niu, X., Secades, B., & Stevens, H. (2026). Impact of drug repurposing between 1985 and 2024 on pharmaceutical innovation. *Communications Medicine*, *6*(84). https://doi.org/10.1038/s43856-025-01344-1

Alahari, S. K. (2003). Nischarin inhibits Rac induced migration and invasion of epithelial cells by affecting signaling cascades involving PAK. *Experimental Cell Research*, *288*(2), 415–424. https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00233-7

Alahari, S. K., Lee, J. W., & Juliano, R. L. (2000). Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin α5 subunit and inhibits cell migration. *Journal of Cell Biology*, *151*(6), 1141–1154. https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1141

Alahari, S. K., & Nasrallah, H. (2004). A membrane proximal region of the integrin alpha5 subunit is important for its interaction with nischarin. *Biochemical Journal*, *377*(Pt 2), 449. https://doi.org/10.1042/BJ20030411

Alahari, S. K., Reddig, P. J., & Juliano, R. L. (2004). The integrin-binding protein Nischarin regulates cell migration by inhibiting PAK. *EMBO Journal*, *23*(14), 2777–2788. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600291

Alimonti, A., Carracedo, A., Clohessy, J. G., Trotman, L. C., Nardella, C., Egia, A., Salmena, L., Sampieri, K., Haveman, W. J., Brogi, E., Richardson, A. L., Zhang, J., & Pandolfi, P. P. (2010). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nature Genetics*, *42*(5), 454–458. https://doi.org/10.1038/ng.556

Amna, S., Øhlenschlæger, T., Sædder, E. A., Sigaard, J. V., & Bergmann, T. K. (2024). Review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of clonidine as an adjunct to opioids in palliative care. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *134*(4), 485–497. https://doi.org/10.1111/BCPT.13979

Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, *11*(10), R106. https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-10-R106

Armstrong, B. K., & Kricker, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *63*(1–3), 8–18. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00198-1

Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., Cust, A. E., De Vries, E., Whiteman, D. C., & Bray, F. (2022). Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatology*, *158*(5), 495–503. https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2022.0160

Avagliano, A., Fiume, G., Pelagalli, A., Sanità, G., Ruocco, M. R., Montagnani, S., & Arcucci, A. (2020). Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, *10*. https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00722

Avivar-Valderas, A., Bobrovnikova-Marjon, E., Alan Diehl, J., Bardeesy, N., Debnath, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2013). Regulation of autophagy during ECM detachment is linked to a selective inhibition of mTORC1 by PERK. *Oncogene*, *32*(41), 4932–4940. https://doi.org/10.1038/ONC.2012.512

Babic, Z., Rancic, N., Ilic, S., Corovic, S., Milicic, V., Djordjevic, G., Djordjevic, O., Ilic, S., & Radevic, S. (2024). Trends in Melanoma Mortality in Serbia: A 22-Year Population-Based Study. *Iranian Journal of Public Health*, *53*(4), 828. https://doi.org/10.18502/ijph.v53i4.15559

Baranwal, S., Wang, Y., Rathinam, R., Lee, J., Jin, L., McGoey, R., Pylayeva, Y., Giancotti, F., Blobe, G. C., & Alahari, S. K. (2011). Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(20), 1513–1528. https://doi.org/10.1093/jnci/djr350

Bartkova, J., Lukas, J., Guldberg, P., Alsner, J., Kirkin, A. F., Zeuthen, J., & Bartek, J. (1996). The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Research*, *56*(23), 5475–5483.

Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(9), a019505. https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019505

Bennett, D. F., Goyala, A., Statzer, C., Beckett, C. W., Tyshkovskiy, A., Gladyshev, V. N., Ewald, C. Y., & de Magalhães, J. P. (2023). Rilmenidine extends lifespan and healthspan in Caenorhabditis elegans via a nischarin I1-imidazoline receptor. *Aging Cell*, *22*(2). https://doi.org/10.1111/ACEL.13774

Benton, G., Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., & Koblinski, J. (2014). Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *79*, 3–18. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.005

Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2013 14:8*, *14*(8), 518–528. https://doi.org/10.1038/nrm3629

Biechele, T. L., Kulikauskas, R. M., Toroni, R. A., Lucero, O. M., Swift, R. D., James, R. G., Robin, N. C., Dawson, D. W., Moon, R. T., & Chien, A. J. (2012). Wnt/β-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAF V600E in human melanoma. *Science Signaling*, *5*(206). https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2002274

Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J., & Tuveson, D. A. (2019). Il1-induced Jak/STAT signaling is antagonized by TGFβ to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, *9*(2), 282–301. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0710

Bousquet, P. (2000). Identification and characterization of I1 imidazoline receptors: their role in blood pressure regulation. *American Journal of Hypertension*, *13*(S4), 84S-88S. https://doi.org/10.1016/S0895-7061(00)00223-5

Bousquet, P., Hudson, A., García-Sevilla, J. A., & Li, J. X. (2020). Imidazoline receptor system: The past, the present, and the future. *Pharmacological Reviews*, *72*(1), 50–79. https://doi.org/10.1124/pr.118.016311

Bruzzone, A., Piñero, C. P., Castillo, L. F., Sarappa, M. G., Rojas, P., Lanari, C., & Lüthy, I. A. (2008). α 2-Adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. *British Journal of Pharmacology*, *155*(4), 494–504. https://doi.org/10.1038/BJP.2008.278

Burridge, K. (2017). Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *The FEBS Journal*, *284*(20), 3355–3361. https://doi.org/10.1111/FEBS.14195

Cabaço, L. C., Tomás, A., Pojo, M., & Barral, D. C. (2022). The Dark Side of Melanin Secretion in Cutaneous Melanoma Aggressiveness. *Frontiers in Oncology*, *12*, 887366. https://doi.org/10.3389/FONC.2022.887366

Cai, Y. J., Ma, B., Wang, M. L., Chen, J., Zhao, F. G., Zhou, J. Di, Guo, X., Zheng, L., Xu, C. J., Wang, Y., He, Y. B., Liu, J., & Xie, S. N. (2020). Impact of Nischarin on EMT regulators in breast cancer cell lines. *Oncology Letters*, *20*(6). https://doi.org/10.3892/OL.2020.12154

Cancer Facts & Figures 2026 | American Cancer Society. (n.d.). Retrieved February 3, 2026, from https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2026-cancer-facts-figures.html

Caraviello, C., Nazzaro, G., Tavoletti, G., Boggio, F., Denaro, N., Murgia, G., Passoni, E., Benzecry Mancin, V., & Marzano, A. V. (2025). Melanoma Skin Cancer: A Comprehensive Review of Current Knowledge. *Cancers 2025, Vol. 17, Page 2920*, *17*(17), 2920. https://doi.org/10.3390/CANCERS17172920

Castro-Castro, A., Marchesin, V., Monteiro, P., Lodillinsky, C., Rossé, C., & Chavrier, P. (2016). Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *32*, 555–576. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-111315-125227

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, *2*(5), 401–404. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095

Chatziioannou, E., Lallas, K., Sinnberg, T., Niessner, H., Stratigos, A. J., Flatz, L., & Amaral, T. (2026). Insights into RAS-driven melanoma and its therapeutic implications. *Cancer Treatment Reviews*, *143*, 103090. https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2026.103090

Chien, A. J., Haydu, L. E., Biechele, T. L., Kulikauskas, R. M., Rizos, H., Kefford, R. F., Scolyer, R. A., Moon, R. T., & Long, G. V. (2014). Targeted BRAF Inhibition Impacts Survival in Melanoma Patients with High Levels of Wnt/β-Catenin Signaling. *PLOS ONE*, *9*(4), e94748. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094748

Chien, A. J., Moore, E. C., Lonsdorf, A. S., Kulikauskas, R. M., Rothberg, B. G., Berger, A. J., Major, M. B., Hwang, S. T., Rimm, D. L., & Moon, R. T. (2009). Activated Wnt/ß-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(4), 1193–1198. https://doi.org/10.1073/PNAS.0811902106

Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, *15*(12), 1147–1165. https://doi.org/10.1016/S0046-8177(84)80310-X

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology 2016 17:1*, *17*(1), 13-. https://doi.org/10.1186/S13059-016-0881-8

Damsky, W., Micevic, G., Meeth, K., Muthusamy, V., David, P., Santhankrishnan, M., Erdelyi, I., Platt, J. T., Huang, L., Theodosakis, N., Zaidi, M. R., Tighe, S., Davies, M. A., & Dankort, D. (2015). mTORC1 activation blocks BrafV600E -induced growth-arrest, but is insufficient for melanoma formation. *Cancer Cell*, *27*(1), 41–56. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.014.

De Luca, N., Izzo, R., Fontana, D., Iovino, G., Argenziano, L., Vecchione, C., & Trimarco, B. (2000). Haemodynamic and metabolic effects of rilmenidine in hypertensive patients with metabolic syndrome X. A double-blind parallel study versus amlodipine. *Journal of Hypertension*, *18*(10), 1515–1522. https://doi.org/10.1097/00004872-200018100-00021

de Vries, E., Nijsten, T. E. C., Visser, O., Bastiaannet, E., van Hattem, S., Janssen-Heijnen, M. L., & Coebergh, J. W. W. (2008). Superior survival of females among 10 538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Annals of Oncology*, *19*(3), 583–589. https://doi.org/10.1093/annonc/mdm498

Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, *25*(10), 1010–1022. https://doi.org/10.1101/GAD.2037511

Ding, Y., Li, Y., Lu, L., Zhang, R., Zeng, L., Wang, L., & Zhang, X. (2015). Inhibition of Nischarin Expression Promotes Neurite Outgrowth through Regulation of PAK Activity. *PloS One*, *10*(12), e0144948. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144948

Ding, Y., Milosavljevic, T., & Alahari, S. K. (2008). Nischarin inhibits LIM kinase to regulate cofilin phosphorylation and cell invasion. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(11), 3742–3756. https://doi.org/10.1128/mcb.01832-07

Ding, Y., Zhang, R., Zhang, K., Lv, X., Chen, Y., Li, A., Wang, L., Zhang, X., & Xia, Q. (2013). Nischarin Is Differentially Expressed in Rat Brain and Regulates Neuronal Migration. *PLoS ONE*, *8*(1), 3–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054563

Dollery, C. T., Davies, D. S., Duchier, J., Pannier, B., & Safar, M. E. (1988). Dose and concentration-effect relations for rilmenidine. *American Journal of Cardiology*, *61*(7), D60–D66. https://doi.org/10.1016/0002-9149(88)90467-5

Dong, S., Baranwal, S., Garcia, A., Serrano-Gomez, S. J., Eastlack, S., Iwakuma, T., Mercante, D., Mauvais-Jarvis, F., & Alahari, S. K. (2017). Nischarin inhibition alters energy metabolism by activating AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(41), 16833–16846. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784256

Dong, S., Blüher, M., Zhang, Y., Wu, H., & Alahari, S. K. (2019). Development of insulin resistance in Nischarin mutant female mice. *International Journal of Obesity*, *43*(5), 1046–1057. https://doi.org/10.1038/s41366-018-0241-8

Dong, S., Ruiz-Calderon, B., Rathinam, R., Eastlack, S., Maziveyi, M., & Alahari, S. K. (2020). Knockout model reveals the role of Nischarin in mammary gland development, breast tumorigenesis and response to metformin treatment. *International Journal of Cancer*, *146*(9), 2576–2587. https://doi.org/10.1002/ijc.32690

Dupuy, L., Urosevic, D., Greney H., Quaglia W., Pigini M., Brasili L., Dontenwill M., & Bousquet P. (2004). I1 imidazoline receptor-mediated effects on apoptotic processes in PC12 cells. *Cell Death and Differentiation*, *11*(9), 1049–1052. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401447

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, *12*(4), 207–218. https://doi.org/10.1089/ADT.2014.573

Edwards, L. P., Brown-Bryan, T. A., Mclean, L., & Ernsberger, P. (2012). Pharmacological Properties of the Central Antihypertensive Agent, Moxonidine. *Cardiovascular Therapeutics*, *30*(4), 199–208. https://doi.org/10.1111/J.1755-5922.2011.00268.X

Farsang, C., & Kapocsi, J. (1999). Imidazoline receptors: From discovery to antihypertensive therapy (facts and doubts). *Brain Research Bulletin*, *49*(5), 317–331. https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00057-X

Ferguson, J., Arozarena, I., Ehrhardt, M., & Wellbrock, C. (2013). Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and invasion. *Oncogene*, *32*(1), 86–96. https://doi.org/10.1038/onc.2012.25

Fero, M. L., Randel, E., Gurley, K. E., Roberts, J. M., & Kemp, C. J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature 1998 396:6707*, *396*(6707), 177–180. https://doi.org/10.1038/24179

Fischer, G. M., Jalali, A., Kircher, D. A., Lee, W. C., McQuade, J. L., Haydu, L. E., Joon, A. Y., Reuben, A., de Macedo, M. P., Carapeto, F. C. L., Yang, C., Srivastava, A., Ambati, C. R., Sreekumar, A., Hudgens, C. W., Knighton, B., Deng, W., Ferguson, S. D., Tawbi, H. A., … Davies, M. A. (2019). Molecular profiling reveals unique immune and metabolic features of melanoma brain metastases. *Cancer Discovery*, *9*(5), 628–645. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1489

Fischer, M., & Müller, G. A. (2017). Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *52*(6), 638–662. https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1360836

Forget, P., Berlière, M., Poncelet, A., & De Kock, M. (2018). Effect of clonidine on oncological outcomes after breast and lung cancer surgery. *British Journal of Anaesthesia*, *121*(1), 103–104. https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.04.020

Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, *188*(1), 11–19. https://doi.org/10.1083/JCB.200909003

Fu, Q., Chen, N., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zeng, B., Li, C., Wang, Y., Xue, Y., Song, X., Li, H., & Li, G. (2019). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*, *8*(7), 1593806. https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593806

Fu, W., Hall, J. E., & Schaller, M. D. (2012). Focal adhesion kinase-regulated signaling events in human cancer. *Biomolecular Concepts*, *3*(3), 225–240. https://doi.org/10.1515/BMC-2011-0049

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., … Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation 2018 25:3*, *25*(3), 486–541. https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4

Gama-Carvalho, M., & Carmo-Fonseca, M. (2001). The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Letters*, *498*(2–3), 157–163. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02487-5

Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, *6*(269), pl1. https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088

Gao, Z., Shang, Q., Liu, Z., Deng, C., & Guo, C. (2015). Mitochondrial ATF2 translocation contributes to apoptosis induction and BRAF inhibitor resistance in melanoma through the interaction of Bim with VDAC1. *Oncotarget*, *6*(34), 36338–36353. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5537

Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, *27*(1), 3–9. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.001

Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death and Differentiation*, *12*, 1473–1477. https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401723

Giunta, E. F., De Falco, V., Napolitano, S., Argenziano, G., Brancaccio, G., Moscarella, E., Ciardiello, D., Ciardiello, F., & Troiani, T. (2020). Optimal treatment strategy for metastatic melanoma patients harboring BRAF-V600 mutations. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *12*. https://doi.org/10.1177/1758835920925219

GLOBOCAN 2022, Serbia. (n.d.). Retrieved February 3, 2026, from https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheet.pdf

Good, M. C., Zalatan, J. G., & Lim, W. A. (2011). Scaffold proteins: Hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*, *332*(6030), 680–686. https://doi.org/10.1126/science.1198701

Grady, W. M., Willis, J., Guilford, P. J., Dunbier, A. K., Toro, T. T., Lynch, H., Wiesner, G., Ferguson, K., Eng, C., Park, J. G., Kim, S. J., & Markowitz, S. (2000). Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature Genetics 2000 26:1*, *26*(1), 16–17. https://doi.org/10.1038/79120

Grahovac, J., Srdić-Rajić, T., Santibañez, J. F., Pavlović, M., Čavić, M., & Radulović, S. (2019). Telmisartan induces melanoma cell apoptosis and synergizes with vemurafenib in vitro by altering cell bioenergetics. *Cancer Biology & Medicine*, *16*(2), 247–263. https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2018.0375

Guo, W., Wang, H., & Li, C. (2021). Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6

Gupta, S., Artomov, M., Goggins, W., Daly, M., & Tsao, H. (2015). Gender Disparity and Mutation Burden in Metastatic Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *107*(11), 221. https://doi.org/10.1093/JNCI/DJV221

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003

Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G. C., Frederick, D. T., Hurley, A. D., Nellore, A., Kung, A. L., Wargo, J. A., Song, J. S., Fisher, D. E., Arany, Z., & Widlund, H. R. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1α and MITF. *Cancer Cell*, *23*(3), 302–315. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003

Harvey, J. A., Lehman, J. S., Lohse, C. M., Chamberlain, A. M., Markovic, S. N., Vachon, C. M., & Brewer, J. D. (2022). BRAF V600E Expression in Primary Melanoma and Its Association With Death: A Population-Based, Retrospective, Cross-Sectional Study. *Cutis*, *109*(5), 279. https://doi.org/10.12788/CUTIS.0515

Hassan, S. N., & Ahmad, F. (2026). Looking at the fraction with Annexin V^+ and propidium $iodide^+$: insights into cell death types from preclinical studies in solid and haematological cancers. *Apoptosis 2026 31:3*, *31*(3), 95-. https://doi.org/10.1007/S10495-026-02261-X

Haupt, S., Caramia, F., Klein, S. L., Rubin, J. B., & Haupt, Y. (2021). Sex disparities matter in cancer development and therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *21*(6), 393. https://doi.org/10.1038/S41568-021-00348-Y

Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S. R., Gnarra, J. R., Linehan, W. M., & Baylin, S. B. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(21), 9700–9704. https://doi.org/10.1073/PNAS.91.21.9700

Hoek, K. S., Eichhoff, O. M., Schlegel, N. C., Döbbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., & Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Research*, *68*(3), 650–656. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2491

Hua, H. K., Zhu, H. M., & Zhang, Z. G. (2024). Clinical significance of downregulated NISCH expression in skin cutaneous melanoma: Modulation of tumor cell invasion, migration, and EMT via PAK1 inhibition. *Tissue and Cell*, *88*(8), 102399. https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102399

Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673–687. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6

Islami, F., Sauer, A. G., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Minihan, A. K., Geller, A. C., Lichtenfeld, J. L., & Jemal, A. (2020). Cutaneous melanomas attributable to ultraviolet radiation exposure by state. *International Journal of Cancer*, *147*(5), 1385–1390. https://doi.org/10.1002/IJC.32921

Jain, P., Baranwal, S., Dong, S., Struckhoff, A. P., Worthylake, R. A., & Alahari, S. K. (2013). Integrin-binding protein nischarin interacts with tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1) to regulate cell migration of breast epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(22), 15495–15509. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418103

Ji, Y., Hao, H., Reynolds, K., McMahon, M., & Zhou, C. J. (2019). Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis. *Cells*, *8*(10), 1173. https://doi.org/10.3390/CELLS8101173

Jin, L., Wessely, O., Marcusson, E. G., Ivan, C., Calin, G. A., & Alahari, S. K. (2013). Prooncogenic factors miR-23b and miR-27b are regulated by Her2/Neu, EGF, and TNF-A in breast cancer. *Cancer Research*, *73*(9), 2884–2896. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2162

Joosse, A., Collette, S., Suciu, S., Nijsten, T., Lejeune, F., Kleeberg, U. R., Coebergh, J. W. W., Eggermont, A. M. M., & De Vries, E. (2012). Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: Pooled analysis of four European organisation for research and treatment of cancer phase III trials. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(18), 2240–2247. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.0584

Jung, H., Yoon, S. R., Lim, J., Cho, H. J., & Lee, H. G. (2020). Dysregulation of Rho GTPases in Human Cancers. *Cancers*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/CANCERS12051179

Kabbarah, O., Nogueira, C., Feng, B., Nazarian, R. M., Bosenberg, M., Wu, M., Scott, K. L., Kwong, L. N., Xiao, Y., Cordon-Cardo, C., Granter, S. R., Ramaswamy, S., Golub, T., Duncan, L. M., Wagner, S. N., Brennan, C., & Chin, L. (2010). Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PloS One*, *5*(5), e10770. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010770

Kajstura, M., Halicka, H. D., Pryjma, J., & Darzynkiewicz, Z. (2007). Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "Sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry Part A*, *71*(3), 125–131. https://doi.org/10.1002/CYTO.A.20357

Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, *53*(282), 457–481. https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452

Karponis, D., Joshy, J., Stratigos, I. A., Craig, P. J., Mistry, K., van Bodegraven, B., Venables, Z. C., & Levell, N. J. (2025). Cutaneous melanoma in situ: a review. *Clinical and Experimental Dermatology*, *50*(3), 529–536. https://doi.org/10.1093/CED/LLAE465

Katoh, K. (2024). Signal Transduction Mechanisms of Focal Adhesions: Src and FAK-Mediated Cell Response. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *29*(11). https://doi.org/10.31083/j.fbl2911392

Keung, E. Z., & Gershenwald, J. E. (2018). The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *18*(8), 775. https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1489246

Khosla, M., Dong, S., & Alahari, S. K. (2025). Abstract P4-10-29: Repurposing hypertensive drugs for breast cancer therapies. *Clinical Cancer Research*, *31*(12_Supplement), P4-10–29. https://aacrjournals.org/clincancerres/article/31/12_Supplement/P4-10-29/762708/Abstract-P4-10-29-Repurposing-hypertensive-drugs

Kim, C., Lee, C. W., Kovacic, L., Shah, A., Klasa, R., & Savage, K. J. (2010). Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. *The Oncologist*, *15*(7), 765. https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2009-0237

Kim, H., & Kim, M. M. (2017). Effect of agmatine sulfate on modulation of matrix metalloproteinases via PI3K/Akt-1 in HT1080 cells. *Anticancer Research*, *37*(11), 6303–6309. https://doi.org/10.21873/anticanres.12081

Knight, A., Karapetyan, L., & Kirkwood, J. M. (2023). Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Future Directions. *Cancers 2023, Vol. 15*, *15*(4). https://doi.org/10.3390/cancers15041106

Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(4), 820–823. https://doi.org/10.1073/PNAS.68.4.820

Koch, A., De Meyer, T., Jeschke, J., & Van Criekinge, W. (2015). MEXPRESS: visualizing expression, DNA methylation and clinical TCGA data. *BMC Genomics*, *16*(1), 636. https://doi.org/10.1186/S12864-015-1847-Z

Koch, A., Jeschke, J., Van Criekinge, W., Van Engeland, M., & De Meyer, T. (2019). MEXPRESS update 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W561–W565. https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ445

Kolli-Bouhafs, K., Sick, E., Noulet, F., Gies, J. P., De Mey, J., & Rondé, P. (2014). FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. *Cell Death & Disease*, *5*(8), e1379. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.329

Koltai, T., & Fliegel, L. (2026). Anoikis: To Die or Not to Die? *International Journal of Molecular Sciences*, *27*(2), 579. https://doi.org/10.3390/IJMS27020579

Krishnamurthy, K., Mishra, T. K., Saxena, A., Daga, M. K., Khurana, N., Masroor, M., & Jamatia, E. (2019). Evaluating NISCH and CDH1 promoter hypermethylation in nonsmokers, cancer free smokers and lung cancer patients: a case control study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *34*(4), 458–464. https://doi.org/10.1007/s12291-018-0767-5

Kuijl, C., Pilli, M., Alahari, S. K., Janssen, H., Khoo, P.-S. S., Ervin, K. E., Calero, M., Jonnalagadda, S., Scheller, R. H., Neefjes, J., & Junutula, J. R. (2013). Rac and Rab GTPases dual effector Nischarin regulates vesicle maturation to facilitate survival of intracellular bacteria. *The EMBO Journal*, *32*(5), 713–727. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.10

Kumar, M. S., Pester, R. E., Chen, C. Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D. G., Golub, T. R., & Jacks, T. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes & Development*, *23*(23), 2700–2704. https://doi.org/10.1101/GAD.1848209

Kusakabe, M., Onishi, Y., Tada, H., Kurihara, F., Kusao, K., Furukawa, M., Iwai, S., Yokoi, M., Sakai, W., & Sugasawa, K. (2019). Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes and Environment*, *41*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/S41021-019-0119-6

Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, *168*(4), 670–691. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037

Lasithiotakis, K., Leiter, U., Meier, F., Eigentler, T., Metzler, G., Moehrle, M., Breuninger, H., & Garbe, C. (2008). Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer*, *112*(8), 1795–1804. https://doi.org/10.1002/cncr.23359

Laurent, S., & Safar, M. (1992). Rilmenidine: a novel approach to first-line treatment of hypertension. *American Journal of Hypertension*, *5*(4 Pt 2), 99s-105s. https://doi.org/10.1093/AJH/5.4.99S

Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *16*(5), 281–298. https://doi.org/10.1038/nrm3979

Law, M. H., MacGregor, S., & Hayward, N. K. (2012). Melanoma genetics: Recent findings take us beyond well-traveled pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(7), 1763–1774. https://doi.org/10.1038/jid.2012.75

Lewis, J. L., Bonner, J., Modrell, M., Ragland, J. W., Moon, R. T., Dorsky, R. I., & Raible, D. W. (2004). Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development*, *131*(6), 1299–1308. https://doi.org/10.1242/DEV.01007

Li, C. H., Haider, S., Shiah, Y. J., Thai, K., & Boutros, P. C. (2018). Sex Differences in Cancer Driver Genes and Biomarkers. *Cancer Research*, *78*(19), 5527–5537. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0362

Li, F., Wu, N., Su, R., Chen, Y., Lu, X., Liu, Y., & Li, J. (2012). Imidazoline receptor antisera-selected/Nischarin regulates the effect of agmatine on the development of morphine dependence. *Addiction Biology*, *17*(2), 392–408. https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00373.x

Li, G., Regunathan, S., Barrow, C. J., Eshraghi, J., Cooper, R., & Reis, D. J. (1994). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5149), 966–969. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7906055

Li, J., He, X., Dong, R., Wang, Y., Yu, J., & Qiu, H. (2015). Frequent loss of NISCH promotes tumor proliferation and invasion in ovarian cancer via inhibiting the FAK signal pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(5), 1202–1212. https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-14-0911

Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Systems*, *1*(6), 417–425. https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004

Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdóttir, H., Tamayo, P., & Mesirov, J. P. (2011). Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*, *27*(12), 1739–1740. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR260

Lim, K. P., & Hong, W. (2004). Human Nischarin/imidazoline receptor antisera-selected protein is targeted to the endosomes by a combined action of a PX domain and a coiled-coil region. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54770–54782. https://doi.org/10.1074/jbc.M411315200

Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J., & Pollard, J. W. (2003). Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. *American Journal of Pathology*, *163*(5), 2113–2126. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63568-7

Lincoln Edwards, Lancelot Mclean, Edwards, L. P., & Mclean, L. (2011). Moxonidine an Antihypertensive Agent Sensitizes Cancer Cells to Apoptosis. *89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR)*. https://www.researchgate.net/publication/266767021_Moxonidine_an_Antihypertensive_Agent_Sensitizes_Cancer_Cells_to_Apoptosis

Lista C. Lekovi sa posebnim režimom izdavanja. (n.d.).

Liu, D., Schilling, B., Liu, D., Sucker, A., Livingstone, E., Jerby-Amon, L., Zimmer, L., Gutzmer, R., Satzger, I., Loquai, C., Grabbe, S., Vokes, N., Margolis, C. A., Conway, J., He, M. X., Elmarakeby, H., Dietlein, F., Miao, D., Tracy, A., … Schadendorf, D. (2019). Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine*, *25*(12), 1916–1927. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0654-5

Loginov, V. I., Bazov, I. V., Khodyrev, D. S., Pronina, I. V., Kazubskaya, T. P., Ermilova, V. D., Garkavtseva, R. F., Zabarovsky, E. R., & Braga, E. A. (2008). Human chromosome 3P regions of putative tumor-suppressor genes in renal, breast, and ovarian carcinomas. *Russian Journal of Genetics*, *44*(2), 209–214. https://doi.org/10.1134/s1022795408020142

Lopez-Ojeda, W., Pandey, A., Alhajj, M., & Oakley, A. M. (2022). Anatomy, Skin (Integument). *StatPearls*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer 2009 9:3*, *9*(3), 153–166. https://doi.org/10.1038/nrc2602

Martincorena, I., & Campbell, P. J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, *349*(6255), 1483–1489. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAB4082

Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 74–88. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3

Matthews, N. H., Li, W. Q., Qureshi, A. A., Weinstock, M. A., & Cho, E. (2017). Epidemiology of Melanoma. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, 3–22. https://doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017.ch1

Maziveyi, M., & Alahari, S. K. (2015). Breast cancer tumor suppressors: A special emphasis on novel protein nischarin. *Cancer Research*, *75*(20), 4252–4259. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1395

Maziveyi, M., Dong, S., Baranwal, S., & Alahari, S. K. (2018). Nischarin regulates focal adhesion and Invadopodia formation in breast cancer cells. *Molecular Cancer*, *17*(21), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0764-6

Maziveyi, M., Dong, S., Baranwal, S., Mehrnezhad, A., Rathinam, R., Huckaba, T. M., Mercante, D. E., Park, K., & Alahari, S. K. (2019). Exosomes from nischarin-expressing cells reduce breast cancer cell motility and tumor growth. *Cancer Research*, *79*(9), 2152–2166. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0842

McLean, L. S., Crane, L., Baziard-Mouysset, G., & Edwards, L. P. (2014). Antiproliferative effect induced by novel imidazoline S43126 in PC12 cells is mediated by ROS, stress activated MAPKs and caspases. *Pharmacological Reports*, *66*(6), 937–945. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.003

Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, *164*(2), 192–204. https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.04.045

Michielin, O., Atkins, M. B., Koon, H. B., Dummer, R., & Ascierto, P. A. (2020). Evolving impact of long-term survival results on metastatic melanoma treatment. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *8*(2), e000948. https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000948

Mishra, Y. G., Indumathi, A., Khumukcham, S. S. S., & Manavathi, B. (2026). Decoding Rho GTPase signalling networks in directed cell migration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *14*, 1818051. https://doi.org/10.3389/FCELL.2026.1818051

Mooradian, M. J., & Sullivan, R. J. (2019). What to Do When Anti-PD-1 Therapy Fails in Patients With Melanoma. *Oncology (08909091)*, *33*(4), 141. https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:135978062?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:gcd:135978062

Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., … Groop, L. C. (2003). PGC-1α-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, *34*(3), 267–273. https://doi.org/10.1038/ng1180

Motwani, J., & Eccles, M. R. (2021). Genetic and Genomic Pathways of Melanoma Development, Invasion and Metastasis. *Genes*, *12*(10), 1543. https://doi.org/10.3390/genes12101543

Mousson, A., Legrand, M., Steffan, T., Vauchelles, R., Carl, P., Gies, J. P., Lehmann, M., Zuber, G., De Mey, J., Dujardin, D., Sick, E., & Rondé, P. (2021). Inhibiting fak–paxillin interaction reduces migration and invadopodia-mediated matrix degradation in metastatic melanoma cells. *Cancers*, *13*(8), 1871. https://doi.org/10.3390/cancers13081871

Muramatsu, I., & Kigoshi, S. (1992). Tizanidine May Discriminate between Imidazoline-Receptors and α 2-Adrenoceptors. *The Japanese Journal of Pharmacology*, *59*(4), 457–459. https://doi.org/10.1254/jjp.59.457

Nair, A., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, *7*(2), 27. https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703

Neuendorf, H. M., Simmons, J. L., & Boyle, G. M. (2023). Therapeutic targeting of anoikis resistance in cutaneous melanoma metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *11*, 1183328. https://doi.org/10.3389/FCELL.2023.1183328

Ng, T. L., Leprivier, G., Robertson, M. D., Chow, C., Martin, M. J., Laderoute, K. R., Davicioni, E., Triche, T. J., & Sorensen, P. H. B. (2012). The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis. *Cell Death and Differentiation*, *19*(3), 501–510. https://doi.org/10.1038/CDD.2011.119

Nguyen, T. H., Yousefi, H., Okpechi, S. C., Lauterboeck, L., Dong, S., Yang, Q., & Alahari, S. K. (2022). Nischarin Deletion Reduces Oxidative Metabolism and Overall ATP : A Study Using a Novel NISCH Δ 5-6 Knockout Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1374. https://doi.org/10.3390/IJMS23031374

Nikolić, K., Filipić, S., & Agbaba, D. (2013). Ligandi I1 -Imidazolinskih receptora sa centralnim antihipertenzivnim dejstvom. *Arh.Farm.*, *63*, 293–306.

NISCH - Nischarin - Homo sapiens (Human) | UniProtKB. (n.d.). Retrieved August 3, 2026, from https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9Y2I1/entry

Oh, J., Kim, S., Hwang, S. H., Son, Y., Lee, J., Kim, J., López Sánchez, G. F., Pizzol, D., Hwang, J., & Yon, D. K. (2026). Global patterns of melanoma, burden attributable to ultraviolet radiation exposure, and projections to 2050 across 185 countries: A population-based study with global modeling. *JAAD International*, *27*, 149. https://doi.org/10.1016/J.JDIN.2026.05.026

Okpechi, S. C., Yousefi, H., Nguyen, K., Cheng, T., Alahari, N. V., Collins-Burow, B., Burow, M. E., & Alahari, S. K. (2022). Role of Nischarin in the pathology of diseases: a special emphasis on breast cancer. *Oncogene*, *41*(8), 1079–1086. https://doi.org/10.1038/s41388-021-02150-4

Ostojić, M., Đurić, A., Živić, K., & Grahovac, J. (2024). Analysis of the nischarin expression across human tumor types reveals its context-dependent role and a potential as a target for drug repurposing in oncology. *PLOS ONE*, *19*(5), e0299685. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0299685

Ostrow, K. L., Hoque, M. O., Loyo, M., Brait, M., Siegfried, J. M., Grandis, J. R., Davis, A. G., William, L., Rom, W., & Sidransky, D. (2010). Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by quantitative methylation-specific PCR. *Clinical Cancer Research*, *16*(13), 3463–3472. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3304

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Reports*, *17*(10), 1374–1395. https://doi.org/10.15252/EMBR.201642195

Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, *385*(6616), 537–540. https://doi.org/10.1038/385537a0

Palmieri, G., Colombino, M., Casula, M., Manca, A., Mandalà, M., & Cossu, A. (2018). Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Current Oncology Reports*, *20*(11), 86. https://doi.org/10.1007/s11912-018-0733-7

Pantovic, M., Djordjevic, O., Radevic, S., Bankovic, D., Ilic, K. P., & Radovanovic, S. (2023). Mortality of Malignant Melanoma in Central Serbia, in the Period 1999–2015. *Dermatology Practical & Conceptual*, *13*(1), e2023008. https://doi.org/10.5826/dpc.1301a8

Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(12), 3481–3498. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(4), 252–264. https://doi.org/10.1038/nrc3239

Parker, C. A., Anderson, N. J., Robinson, E. S. J., Price, R., Tyacke, R. J., Husbands, S. M., Dillon, M. P., Eglen, R. M., Hudson, A. L., Nutt, D. J., Crump, M. P., & Crosby, J. (2004). Harmane and harmalan are bioactive components of classical clonidine-displacing substance. *Biochemistry*, *43*(51), 16385–16392. https://doi.org/10.1021/BI048584V

Parmenter, T. J., Kleinschmidt, M., Kinross, K. M., Bond, S. T., Li, J., Kaadige, M. R., Rao, A., Sheppard, K. E., Hugo, W., Pupo, G. M., Pearson, R. B., McGee, S. L., Long, G. V., Scolyer, R. A., Rizos, H., Lo, R. S., Cullinane, C., Ayer, D. E., Ribas, A., … McArthur, G. A. (2014). Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discovery*, *4*(4), 423–433. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0440

Perera, N. D., Sheean, R. K., Lau, C. L., Shin, Y. S., Beart, P. M., Horne, M. K., & Turner, B. J. (2018). Rilmenidine promotes MTOR-independent autophagy in the mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis without slowing disease progression. *Autophagy*, *14*(3), 534–551. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1385674

Perera, N. D., Tomas, D., Wanniarachchillage, N., Cuic, B., Luikinga, S. J., Rytova, V., & Turner, B. J. (2021). Stimulation of mTOR-independent autophagy and mitophagy by rilmenidine exacerbates the phenotype of transgenic TDP-43 mice. *Neurobiology of Disease*, *154*, 105359. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096999612100108X

Piletz, J. E., Deleersnijder, W., Roth, B. L., Ernsberger, P., Zhu, H., & Ziegler, D. (2003). IRAS splice variants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1009*, 419–426. https://doi.org/10.1196/annals.1304.056

Piletz, J. E., Ivanov, T. R., Sharp, J. D., Ernsberger, P., Chang, C. H., Pickard, R. T., Gold, G., Roth, B., Zhu, H., Jones, J. C., Baldwin, J., & Reis, D. J. (2000). Imidazoline receptor antisera-selected (IRAS) cDNA: Cloning and characterization. *DNA and Cell Biology*, *19*(6), 319–329. https://doi.org/10.1089/10445490050043290

Piletz, J. E., Wang, G., & Zhu, H. (2003). Cell signaling by imidazoline-1 receptor candidate, IRAS, and the nischarin homologue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1009*(1), 392–399. https://doi.org/10.1196/annals.1304.053

Pinto, B., Henriques, A. C., Silva, P. M. A., & Bousbaa, H. (2020). Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics 2020, Vol. 12, Page 1186*, *12*(12), 1186. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12121186

Poincioux, R., Lizárraga, F., & Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 17), 3015–3024. https://doi.org/10.1242/JCS.034561

Prell, G. D., Martinelli, G. P., Holstein, G. R., Matulić-Adamić, J., Watanabe, K. A., Chan, S. L. F., Morgan, N. G., Haxhiu, M. A., & Ernsberger, P. (2004). Imidazoleacetic acid-ribotide: An endogenous ligand that stimulates imidazol(in)e receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(37), 13677–13682. https://doi.org/10.1073/PNAS.0404846101

Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *18*(1), 41–58. https://doi.org/10.1038/NRD.2018.168

Reid, J. L. (2000). Rilmenidine: a clinical overview. *American Journal of Hypertension*, *13*(S4), 106S-111S. https://doi.org/10.1016/S0895-7061(00)00226-0

Revach, O. Y., & Geiger, B. (2014). The interplay between the proteolytic, invasive, and adhesive domains of invadopodia and their roles in cancer invasion. *Cell Adhesion & Migration*, *8*(3), 215–225. https://doi.org/10.4161/CAM.27842

Sanborn, J. Z., Chung, J., Purdom, E., Wang, N. J., Kakavand, H., Wilmott, J. S., Butler, T., Thompson, J. F., Mann, G. J., Haydu, L. E., Saw, R. P. M., Busam, K. J., Lo, R. S., Collisson, E. A., Hur, J. S., Spellman, P. T., Cleaver, J. E., Gray, J. W., Huh, N., … Cho, R. J. (2015). Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(35), 10995–11000. https://doi.org/10.1073/PNAS.1508074112

Sano, H., Liu, S. C. H., Lane, W. S., Piletz, J. E., & Lienhard, G. E. (2002). Insulin receptor substrate 4 associates with the protein IRAS. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19439–19447. https://doi.org/10.1074/jbc.M111838200

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960–976. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004

Schaffner, F., Ray, A., & Dontenwill, M. (2013). Integrin α5β1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers*, *5*(4), 27–47. https://doi.org/10.3390/cancers5010027

Schmidt, C., McGonnell, I. M., Allen, S., Otto, A., & Patel, K. (2007). Wnt6 controls amniote neural crest induction through the non-canonical signaling pathway. *Developmental Dynamics*, *236*(9), 2502–2511. https://doi.org/10.1002/DVDY.21260

Schøler, L. V., Reinert, T., Ørntoft, M. B. W., Kassentoft, C. G., Arnadøttir, S. S., Vang, S., Nordentoft, I., Knudsen, M., Lamy, P., Andreasen, D., Mortensen, F. V., Knudsen, A. R., Stribolt, K., Sivesgaard, K., Mouritzen, P., Nielsen, H. J., Laurberg, S., Ørntoft, T. F., & Andersen, C. L. (2017). Clinical implications of monitoring circulating Tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, *23*(18), 5437–5445. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0510

Serrels, A., Lund, T., Serrels, B., Byron, A., McPherson, R. C., Von Kriegsheim, A., Gómez-Cuadrado, L., Canel, M., Muir, M., Ring, J. E., Maniati, E., Sims, A. H., Pachter, J. A., Brunton, V. G., Gilbert, N., Anderton, S. M., Nibbs, R. J. B., & Frame, M. C. (2015). Nuclear FAK Controls Chemokine Transcription, Tregs, and Evasion of Anti-tumor Immunity. *Cell*, *163*(1), 160–173. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.001

Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, *16*(6), 345–358. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37

Shi, H., Hugo, W., Kong, X., Hong, A., Koya, R. C., Moriceau, G., Chodon, T., Guo, R., Johnson, D. B., Dahlman, K. B., Kelley, M. C., Kefford, R. F., Chmielowski, B., Glaspy, J. A., Sosman, J. A., Van Baren, N., Long, G. V., Ribas, A., & Lo, R. S. (2014). Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discovery*, *4*(1), 80–93. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0642

Shivamadhu, M. C., Kukulage, D. S. K., Padmavathi, R., Oppong, D., Mashhadi Ramezani, F., Eldershaw, D. N., Collins, B. M., & Ahn, Y. H. (2026). Redox regulation of cell migration via Nischarin S-glutathionylation. *Free Radical Biology and Medicine*, *243*, 16–28. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2025.11.013

Smyrek, I., Mathew, B., Fischer, S. C., Lissek, S. M., Becker, S., & Stelzer, E. H. K. (2019). E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biology Open*, *8*(1). https://doi.org/10.1242/BIO.037051/2022

Srdic-Rajic, T., Nikolic, K., Cavic, M., Djokic, I., Gemovic, B., Perovic, V., & Veljkovic, N. (2016). Rilmenidine suppresses proliferation and promotes apoptosis via the mitochondrial pathway in human leukemic K562 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *81*, 172–180. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.017

Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H., & Peters, G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *The EMBO Journal*, *17*(17), 5001–5014. https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.17.5001

Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature 2009 458:7239*, *458*(7239), 719–724. https://doi.org/10.1038/nature07943

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(43), 15545–15550. https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102

Sullivan, R. J., & Flaherty, K. T. (2013). Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *European Journal of Cancer*, *49*(6), 1297–1304. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.019

Sun, X., Zhang, N., Yin, C., Zhu, B., & Li, X. (2020). Ultraviolet Radiation and Melanomagenesis: From Mechanism to Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, *10*, 951. https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00951

Sun, Z., Chang, C. H., & Ernsberger, P. (2007). Identification of IRAS/Nischarin as an I1-imidazoline receptor in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Journal of Neurochemistry*, *101*(1), 99–108. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04413.x

Sung, H., Filho, A. M., Laversanne, M., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2026). Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *76*(4). https://doi.org/10.3322/CAAC.70090

Supino, R. (1995). MTT Assays. In S. O'Hare & C. K. Atterwill (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (pp. 137–149). Humana Press. https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137

Taddei, M. L., Giannoni, E., Morandi, A., Ippolito, L., Ramazzotti, M., Callari, M., Gandellini, P., & Chiarugi, P. (2014). Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-24

Talantov, D., Mazumder, A., Yu, J. X., Briggs, T., Jiang, Y., Backus, J., Atkins, D., & Wang, Y. (2005). Novel Genes Associated with Malignant Melanoma but not Benign Melanocytic Lesions. *Clinical Cancer Research*, *11*(20), 7234–7242. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0683

Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W556–W560. https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ430

Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S. M., Wadsworth, M. H., Treacy, D., Trombetta, J. J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., Fallahi-Sichani, M., Dutton-Regester, K., Lin, J. R., Cohen, O., Shah, P., Lu, D., Genshaft, A. S., Hughes, T. K., Ziegler, C. G. K., … Garraway, L. A. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*, *352*(6282), 189–196. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD0501

Tissue expression of NISCH - Summary - The Human Protein Atlas. (n.d.). The Human Protein Atlas Database Version 20.1. Retrieved May 5, 2021, from https://www.proteinatlas.org/ENSG00000010322-NISCH/tissue

Torres-Collado, A. X., Knott, J., & Jazirehi, A. R. (2018). Reversal of Resistance in Targeted Therapy of Metastatic Melanoma: Lessons Learned from Vemurafenib (BRAFV600E-Specific Inhibitor). *Cancers 2018, Vol. 10, 10*(6). https://doi.org/10.3390/cancers10060157

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyarto, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., … Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, *347*(6220), 1260419. https://doi.org/10.1126/science.1260419

Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., Von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnström, H., … Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, *357*(6352). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN2507

Valdez-Salazar, F., Jiménez-Del Rio, L. A., Padilla-Gutiérrez, J. R., Valle, Y., Muñoz-Valle, J. F., & Valdés-Alvarado, E. (2024). Advances in Melanoma: From Genetic Insights to Therapeutic Innovations. *Biomedicines 2024, Vol. 12, 12*(8). https://doi.org/10.3390/biomedicines12081851

Vandyck, H. H., Hillen, L. M., Bosisio, F. M., van den Oord, J., zur Hausen, A., & Winnepenninckx, V. (2021). Rethinking the biology of metastatic melanoma: a holistic approach. *Cancer and Metastasis Reviews 2021 40:2*, *40*(2), 603–624. https://doi.org/10.1007/S10555-021-09960-8

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, *184*(1), 39–51. https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, *340*(6127), 1546–1558. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1235122

Vucicevic, J., Srdic-Rajic, T., Pieroni, M., Laurila, J. M. M., Perovic, V., Tassini, S., Azzali, E., Costantino, G., Glisic, S., Agbaba, D., Scheinin, M., Nikolic, K., Radi, M., & Veljkovic, N. (2016). A combined ligand- and structure-based approach for the identification of rilmenidine-derived compounds which synergize the antitumor effects of doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(14), 3174–3183. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.043

Wang, J., Su, R., Wu, N., Xu, B., Lu, X., Liu, Y., & Li, J. (2005). Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumor cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Pharmacologica Sinica*, *26*(5), 616–622. https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00084.x

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics 2008 10:1*, *10*(1), 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

Weksberg, R., Hughes, S., Moldovan, L., Bassett, A. S., Chow, E. W. C., & Squire, J. A. (2005). A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*, *6*, 180. https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-180

Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2016). The Complexity of the ERK/MAP-Kinase Pathway and the Treatment of Melanoma Skin Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*(APR), 33. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00033

Whiteman, D. C., Olsen, C. M., Wang, H., Law, M. H., Neale, R. E., & Pandeya, N. (2025). A Risk Prediction Tool for Invasive Melanoma. *JAMA Dermatology*, *161*(11), 1123–1131. https://doi.org/10.1001/JAMADERMATOL.2025.3028

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., O'Kane, C. J., Floto, R. A., & Rubinsztein, D. C. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature Chemical Biology*, *4*(5), 295–305. https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.79

Wolf, K., & Friedl, P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology*, *21*(12), 736–744. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.006

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., & Carling, D. (2003). LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Current Biology*, *13*(22), 2004–2008. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031

Wouters, J., Vizoso, M., Martinez-Cardus, A., Carmona, F. J., Govaere, O., Laguna, T., Joseph, J., Dynoodt, P., Aura, C., Foth, M., Cloots, R., van den Hurk, K., Balint, B., Murphy, I. G., McDermott, E. W., Sheahan, K., Jirström, K., Nodin, B., Mallya-Udupi, G., … Esteller, M. (2017). Comprehensive DNA methylation study identifies novel progression-related and prognostic markers for cutaneous melanoma. *BMC Medicine*, *15*(1), 101. https://doi.org/10.1186/s12916-017-0851-3

Wouters, O. J., McKee, M., & Luyten, J. (2020). Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA*, *323*(9), 844. https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166

Yang, Z. H., Cai, X., Ding, Z. L., Li, W., Zhang, C. Y., Huo, J. H., Zhang, Y., Wang, L., Zhang, L. M., Li, S. W., Li, M., Zhang, C., Chang, H., & Xiao, X. (2023). Identification of a psychiatric risk gene NISCH at 3p21.1 GWAS locus mediating dendritic spine morphogenesis and cognitive function. *BMC Medicine 2023 21:1*, *21*(1), 254-. https://doi.org/10.1186/s12916-023-02931-6

Yousef, H., Alhajj, M., Fakoya, A. O., & Sharma, S. (2024). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/

Zekušic, M., Fumic, K., Bilic, K., Škaričic, A., Ramadža, D. P., Žigman, T., Sarnavka, V., Ćuk, M., Baric, I., & Rogic, D. (2017). Put prema biobanci kultiviranih kožnih fibroblasta bolesnika s nasljednim metaboličkim poremećajima u Hrvatskoj. *Paediatria Croatica*, *61*(1), 26–31. https://doi.org/10.13112/PC.2017.3

Zhang, C., Wang, Y., Zhen, Z., Li, J., Su, J., & Wu, C. (2024). mTORC1 Mediates Biphasic Mechano-Response to Orchestrate Adhesion-Dependent Cell Growth and Anoikis Resistance. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, *11*(6). https://doi.org/10.1002/ADVS.202307206

Zhang, F., Wei, H., Wang, X., Bai, Y., Wang, P., Wu, J., Jiang, X., Wang, Y., Cai, H., Xu, T., & Zhou, A. (2017). Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discovery*, *3*(1), 17004-. https://doi.org/10.1038/CELLDISC.2017.4

Zhang, H., Xie, W., Liu, Y., Zhang, B., Peng, M., Li, S., Sheng, X., Ren, H., Gong, Q., Li, Z., Luo, C., Dai, J., Zhou, X., & Long, Y. (2021). MicroRNA-2355-5p Promotes the Proliferation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma via Suppressing NISCH Expression. *Journal of Oncology*, *2021*(1), 2986489. https://doi.org/10.1155/2021/2986489

Zhang, J., & Abdel-Rahman, A. A. (2006). Nischarin as a functional imidazoline (I1) receptor. *FEBS Letters*, *580*(13), 3070–3074. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.058

Zhang, J., & Abdel-Rahman, A. A. (2007). Inhibition of Nischarin Expression Attenuates Rilmenidine-Evoked Hypotension and Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Production in the Rostral Ventrolateral Medulla of Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *324*(1), 72–78. https://doi.org/10.1124/jpet.107.129049

Zhang, L., Zhao, T. Y., Hou, N., Teng, Y., Cheng, X., Wang, B., Chen, Y., Jiang, L., Wu, N., Su, R. Bin, Yang, X., & Li, J. (2013). Generation and primary phenotypes of imidazoline receptor antisera-selected (IRAS) knockout mice. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *19*(12), 978–981. https://doi.org/10.1111/cns.12192

Zhang, R., Chen, H., Guo, K., Bai, Z., Huang, J., Zhang, X., & Ding, Y. (2025). Spatiotemporal expression of Nischarin in developing rat brain mediates neuronal migration via the PAK1/LIMK1/cofilin pathway. *Neuroscience Letters*, *856–858*, 138251. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2025.138251

Zhao, L., Zhao, G., & Xue, Q. (2020). Tizanidine (Hydrochloride) inhibits a549 lung cancer cell proliferation and motility through regulating nischarin. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 291–298. https://doi.org/10.2147/OTT.S228317

Zheng, P., Pan, C., Zhou, C., Liu, B., Wang, L., Duan, S., & Ding, Y. (2023). Contribution of Nischarin/IRAS in CNS development, injury and diseases. *Journal of Advanced Research*, *54*, 43–57. https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.01.020

Živić, K., Pavlović, M., Ostojić, M., Galun, D., Pavić, A., Srdić-Rajić, T., & Grahovac, J. (2026). Repurposing Rilmenidine as a Potential Antimetastatic Therapy Targeting Nischarin in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cells*, *15*(11). https://doi.org/10.3390/CELLS15111032

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Ostojić (rođena Vidosavljević) je rođena 29.09.1991. godine u Kruševcu. Gimnaziju opšteg tipa u Srednjoj školi „Sveti Trifun“ u Aleksandrovcu je završila 2010. godine kao đak generacije. Iste godine je upisala integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, program Farmacija – medicinska biohemija, koje je završila 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,63. Tokom studija se usavršavala kroz stručne prakse na Farmaceutskom fakultetu u Portu, Portugal, i Medicinskom univerzitetu u Lođu, Poljska. U Lođu je uradila i eksperimentalni deo diplomskog rada pod nazivom „Ekspresija *ABCB1* gena kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom“, koji je odbranila sa ocenom 10. Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja za izuzetno nadarene učenike i studente i Fondacije Dragoljub Marinković.

Doktorske studije, modul Molekularna onkologija, je upisala 2016. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od oktobra 2016. do aprila 2018. godine je volontirala u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Institut za nuklearne nauke „Vinča“. U maju 2018. godine je započela rad u Laboratoriji za farmakologiju Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije. Od septembra 2020. do jula 2022. godine je bila angažovana na projektu Fonda za nauku, u okviru poziva PROMIS, pod nazivom „*Drug repurposing in pancreatic ductal adenocarcinoma*“.

Do danas je objavila 9 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od kojih su 2 rada neposredno povezana sa temom doktorske disertacije, i veći broj saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Član je Srpskog društva istraživača raka (SDIR), Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR) i Američkog udruženja za istraživanje raka (AACR).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија З. Остојић

број индекса Б3019/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Експресија нишарина у метастатском меланому и антитуморски потенцијал његових агониста *in vitro*

- 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, _____

_____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија З. Остојић

Број индекса Б3019/2016

Студијски програм Биологија, Молекуларна онкологија

Наслов рада Експресија нишарина у метастатском меланому и антитуморски потенцијал његових агониста *in vitro*

Ментори др Јелена Граховац, виши научни сарадник и др Александра Корач, редовни професор

Потписани/а Марија З. Остојић

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, _____

_____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Експресија нишарина у метастатском меланому и антитуморски потенцијал његових агониста *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

_____

1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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. Дозвољавате 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.