



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милица Н. Димитријевић Стојановић

**Синтеза, карактеризација и потенцијални
антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-
епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских
комплекса платине(II)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Milica N. Dimitrijević Stojanović

Sinteza, karakterizacija i potencijalni antitumorski efekti mononuklearnih 5,6-epoksi-5,6-dihidro-1,10-fenantrolinskih kompleksa platine(II)

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Milica N. Dimitrijevic Stojanovic

**Synthesis, characteristics and potential antitumor
effects of mononuclear 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-
phenanthroline platinum (II) complexes**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Милица Димитријевић Стојановић
Датум и место рођења: 29.9.1988. Књажевац
Садашње запослење: Сарадник у звању асистента за ужу научну област Патолошка анатомија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)
Број страница: 129
Број слика: 4 слика, 35 фигура, 1 схема
Број библиографских података: 416
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Коментори: проф. др Иван Јовановић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија и Онкологија Проф. Марија Живковић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска органска хемија
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 4.3.2021.године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-564/17 од 14.7.2021.године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Доц. др Милена Јуришевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник2. Проф. др Слободанка Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан3. Доц. др Божидар Чобелић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
Датум одбране докторске дисертације:

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Autor
Ime i prezime: Milica Dimitrijević Stojanović
Datum i mesto rođenja: 29.9.1988. Knjaževac
Sadašnje zaposlenje: Saradnik u zvanju asistenta za užu naučnu oblast Patološka anatomija, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Sinteza, karakterizacija i potencijalni antitumorski efekti mononuklearnih 5,6-epoksi-5,6-dihidro-1,10-fenantrolinskih kompleksa platine(II)
Broj stranica: 129
Broj slika: 4 slika, 35 figura, 1 shema
Broj bibliografskih podataka: 416
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Komentori: prof. dr Ivan Jovanović , redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija i Onkologija Prof. Marija Živković , vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska organska hemija
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 4.3.2021.godine
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-564/17 od 14.7.2021.godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: <ol style="list-style-type: none">1. Doc. dr Milena Jurišević, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Klinička farmacija, predsednik2. Prof. dr Slobodanka Mitrović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član3. Doc. dr Božidar Čobeljić, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
Datum odbrane doktorske disertacije:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Autor
Name and surname: Milica Dimitrijevic Stojanovic
Date and place of birth: 29.09.1988. Knjazevac
Current employment: Teaching assistant for the narrow scientific field of Pathological anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Synthesis, characterization and potential antitumor effects of mononuclear 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-phenanthroline complexes of platinum(II)
No. of pages: 129
No. of images: 4 pictures, 35 figures, 1 scheme
No. of bibliographic data: 416
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine
Mentors: Prof. Ivan Jovanovic , Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and immunology and Oncology Assoc. prof. Marija Zivkovic , Associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pharmaceutical organic chemistry
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 4.3.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-564/17, 14.7.2021.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">1. Assis. prof. Milena Jurisevic, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Clinical Pharmacy, president2. Assoc. prof. Slobodanka Mitrovic, Associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pathological anatomy, member3. Assis. prof. Bozidar Cobeljic, Assistant professor at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade for the narrow scientific field of General and inorganic chemistry, member
Commission for evaluation and defense of doctoral dissertation:
Date of Dissertation Defense:

Захваљујем се прво својим коменторима: проф. др Ивану Јовановићу, на стручној помоћи, саветима и привилегији да будем његов докторанд, као и проф. др Марији Живковић, на знању које ми је преносила, стрпљењу и разумевању које је за мене имала. Захваљујем се проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Владимиру Јаковљевићу, на свакој пруженој прилици.

Захвалност дугујем и професорки Весни Станковић, за сваку помоћ и подршку током израде докторске дисертације.

Желела бих да се захвалим и свим члановима комисије: проф. др Слободанки Митровић, доц. Милени Јуришевић и доц. Божидару Чобелићу, на залагању, сарадњи, идејама и сугестијама током целокупне реализације ове докторске дисертације.

Хвала и свима из Центра за Молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу и Службе за патолошку анатомску дијагностику, Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу.

На крају, захвалност дугујем својој породици, својим родитељима Зорици и Небојши, који су ми омогућили да будем најбоља верзија себе, усадили ми упорност и истрајност у свему што радим и сестри Милени због које сам ту где јесам, из жеље да јој будем добар пример. Посебно се захваљујем супругу доц. др Бојану Стојановићу, који ми је био покретач и снага, на великој помоћи, непрекидној мотивацији и охрабривању да наставим у тешким тренуцима нашег заједничког научног путовања.

И највећу захвалност дугујем мојој **Калини и Леони**, зато што су у мој живот, мој рад и труд, унеле смисао.

САЖЕТАК

Увод: Четири Pt(II) комплекса опште формуле [Pt(L)(5,6-ероку-1,10-phen)], где је L анјон малонске киселине (мал, Pt1), 2-метилмалонске киселине (Ме-мал, Pt2), 2,2-диметилмалонске киселине (Ме₂-мал, Pt3) и 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (СВДСА, Pt4) и 5,6-епокси-1,10-фен је 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин.

Материјал и методе: Комплекси су синтетизовани и окарактерисани елементалном микроанализом и различитим спектроскопским техникама. Кристална структура анхидрованог комплекса Pt3 одређена је дифракцијом рендгенских зрака монокристала. Антиканцерогена активност комплекса платине(II) је испитивана у људским и мишјим ћелијским линијама карцинома дојке и колоректума, као и у здравој линији мезенхималних матичних ћелија миша, коришћењем МТТ теста.

Резултати: Испитивани комплекси платине(II) показују снажну цитотоксичну активност против ћелија карцинома дојке миша (4Т1), хуманих (НСТ116) и мишјих (СТ26) ћелија колоректалног карцинома. Pt3 комплекс показује јачу селективност против туморских ћелија у поређењу са другим испитиваним комплексима платине(II) и на тај начин показује корисну антитуморску активност, углавном индукујући апоптозу и инхибицију пролиферације и миграције туморских ћелија. Pt3 комплекс, такође показује значајну *in vivo* антитуморску активност у ортотопском моделу тумора дојке, без токсичности за јетру, бубреге, плућа и срце.

Закључак: Сви резултати указују да новосинтетисани комплекси платине(II) имају добру антитуморску активност на туморске ћелије карцинома дојке и колоректалног карцинома и имају потенцијал да постану могући кандидати у антиканцерској терапији.

Кључне речи: Комплекси платине(II), цитотоксичност, апоптоза, раст карцинома дојке, токсичност

ABSTRACT

Introduction: Four Pt(II) complexes of the general formula [Pt(L)(5,6-epoxy-1,10-phen)], where L is an anion of either malonic acid (mal, Pt1), 2-methylmalonic acid (Me-mal, Pt2), 2,2-dimethylmalonic acid (Me₂-mal, Pt3) or 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid (CBDCA, Pt4) and 5,6-epoxy-1,10-phen is 5,6-epoxy-5,6-dihydro-1,10-phenanthroline.

Material and methods: Complexes were synthesized and characterized by elemental microanalysis and different spectroscopic techniques. The crystal structure of anhydrous Pt3 complex was determined by single crystal X-ray diffraction. The in vitro anticancer activity of the platinum(II) complexes was investigated in human and murine cancer cell lines as well as in a normal murine cell line by MTT assay.

Results: The results show that the investigated platinum(II) complexes exhibit potent cytotoxic activity against murine breast carcinoma cells (4T1), human (HCT116) and murine (CT26) colorectal carcinoma cells. The Pt3 complex shows stronger selectivity against cancer cells compared to other platinum(II) complexes tested and thus exhibits beneficial antitumor activity, mainly by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation and migration. The Pt3 complex also exhibits significant in vivo antitumor activity in the orthotopic 4T1 tumor model without detected liver, kidney, lung, and heart toxicity.

Conclusion: All the results indicate that these novel platinum(II) complexes have good antitumor activity on breast and colorectal cancer and have the potential to become possible candidates for cancer treatment.

Keywords: Platinum(II) complexes, Cytotoxicity, Apoptosis, Breast cancer growth, Toxicity

САДРЖАЈ

1	УВОД.....	1
1.1	Карцином дојке.....	2
1.1.1	Епидемиолошке карактеристике карцинома дојке.....	2
1.1.2	Етиологија карцинома дојке.....	4
1.1.3	Клиничка презентација карцинома дојке.....	5
1.1.4	Макроскопске карактеристике карцинома дојке.....	5
1.1.5	Микроскопске карактеристике карцинома дојке.....	5
1.1.6	Патохистолошки типови карцинома дојке.....	5
1.1.7	TNM класификација карцинома дојке.....	8
1.1.8	Клинички стадијум болести.....	8
1.1.9	Молекуларна субкласификација карцинома дојке.....	9
1.1.10	Хистолошки градус тумора.....	9
1.1.11	Нуклеарни градус тумора.....	10
1.1.12	Путеви ширења карцинома дојке.....	10
1.1.13	Клиничка дијагностика карцинома дојке.....	11
1.1.14	Патохистолошка испитивања карцинома дојке.....	11
1.1.15	Ћелијске линије као модел системи за изучавање карцинома дојке.....	12
1.1.16	Мишји модел карцинома дојке.....	13
1.1.17	Лечење карцинома дојке.....	14
1.2	Колоректални карцином.....	16
1.2.1	Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома.....	16
1.2.2	Етиологија колоректалног карцинома.....	18
1.2.3	Канцерогенеза колоректалног карцинома.....	19
1.2.4	Клиничка презентација колоректалног карцинома.....	20
1.2.5	Макроскопске карактеристике колоректалног карцинома.....	20
1.2.6	Микроскопске карактеристике колоректалног карцинома.....	20
1.2.7	Патохистолошки типови колоректалног карцинома.....	21
1.2.8	Класификација колоректалног карцинома.....	22
1.2.9	Патолошки стадијум колоректалног карцинома.....	22
1.2.10	Хистолошки градус колоректалног карцинома.....	23
1.2.11	Дијагностика колоректалног карцинома.....	24

1.2.12	Ћелијске линије као модел системи испитивања колоректалног карцинома .	26
1.2.13	Мишји модел карцинома колоректума	26
1.2.14	Лечење колоректалног карцинома	26
1.3	Терапијски модалитети у лечењу карцинома	27
1.3.1	Примена комплекса јона метала у антитуморској терапији	28
1.3.2	Цисплатина	29
1.3.3	Токсични ефекти примене цисплатине	30
1.3.4	Карбоплатина	32
1.3.5	Оксалиплатина	32
1.3.6	Нови деривати платине	32
1.3.7	Деривати платине у терапији карцинома дојке	33
1.3.8	Деривати платине у терапији колоректалног карцинома	33
2	ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	34
3	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
3.1	Хемикалије и реагенси	35
3.2	Синтеза мононуклеарних комплекса платине(II), Pt1-Pt4	35
3.3	Карактеризација мононуклеарних комплекса платине(II)	36
3.3.1	Мерење рН вредности	36
3.3.2	Елементална микроанализа	36
3.3.3	Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија NMR (¹ H и ¹³ C) мерења	36
3.3.4	UV-Vis спектрофотометрија	36
3.3.5	Инфрацрвена спектроскопија	36
3.3.6	Рендгенска структурна анализа анхидрованог Pt3 комплекса	37
3.3.7	Испитивање стабилности комплекса Pt1-Pt4 UV-Vis спектрофотометријом .	37
3.4	Испитивање интеракције синтетисаних комплекса платине(II) са DNA	37
3.4.1	UV-Vis спектрофотометријска мерења	37
3.4.2	Флуоресцентна мерења	37
3.5	Мерење вискозитета	38
3.6	Испитивање интеракције синтетисаних комплекса платине(II) са BSA	38
3.7	Методологија <i>in vitro</i> есперимената	39
3.7.1	Линије малигнућ ћелија	39
3.7.2	МТТ тест за испитивање цитотоксичког деловања	40
3.7.3	Анализа апоптотске смрти	41

3.7.4	Анализа потенцијалног про-апоптотског ефекта испитиваног комплекса	41
3.7.5	Анализа експресије Ki-67	42
3.7.6	Тест миграције.....	42
3.8	Методологија у <i>in vivo</i> есперимената	43
3.8.1	Испитивање токсичности новосинтетисаног Pt3 комплекса <i>in vivo</i>	43
3.8.2	Експерименталне животиње	43
3.8.3	Експериментални модел карцинома дојке	43
3.8.4	Одређивање величине и волумена тумора	44
3.8.5	Обрада материјала и бојење хематоксилином и еозином.....	45
3.8.6	Испитивање токсичних ефеката новосинтетисаних комплекса платине	49
3.9	Варијабле мерене у студији.....	49
3.10	Статистичка обрада података.....	49
4	РЕЗУЛТАТИ	50
4.1	Синтеза мононуклеарних Pt(II) комплекса, Pt1–Pt4	50
4.2	Карактеризација мононуклеарних Pt(II) комплекса, Pt1–Pt4	51
4.2.1	Елементална микроанализа комплекса Pt1	51
4.2.2	Елементална микроанализа комплекса Pt2	51
4.2.3	Елементална микроанализа комплекса Pt3	51
4.2.4	Елементална микроанализа комплекса Pt4	52
4.2.5	¹ H и ¹³ C NMR спектроскопска карактеризација Pt1–Pt4 комплекса.....	52
4.2.6	UV-vis спектрофотометријска карактеризација Pt1–Pt4 комплекса.....	56
4.2.7	IR спектроскопска карактеризација Pt1–Pt4 комплекса	56
4.2.8	Рендгенска структурна анализа анхидрованог [Pt(Me ₂ -met)(5,6-епoxy-1,10-phen)] (Pt3) комплекса	58
4.2.9	Стабилност комплекса Pt1-Pt4.....	60
4.3	Интеракције мононуклеарних комплекса платине(II) са DNA.....	60
4.3.1	UV-Vis спектрофотометријска мерења.....	60
4.3.2	Флуоресцентна мерења	61
4.3.3	Мерење вискозитета	62
4.4	Интеракције мононуклеарних комплекса платине(II) са говеђим серум албумином.....	62
4.5	Мононуклеарни 5,6 епокси-дихидро-1,10 фенантролински комплекси платине 1-4 показују антитуморску активност	64
4.6	Новосинтетисани Pt3 комплекс стимулише апоптотску смрт ћелија.....	66

4.7	Новосинтетисани Pt3 комплекс показује антипролиферативни потенцијал.....	72
4.8	Испитивање ефеката новосинтетисаног комплекса <i>in vivo</i> у ортотопском моделу карцинома дојке миша.....	76
4.9	Новоиспитивани комплекс успорава раст примарног тумора.....	76
4.10	<i>In vivo</i> испитивање токсичности новосинтетисаног Pt3 комплекса.....	79
5	ДИСКУСИЈА	84
5.1	Синтеза и карактеризација Pt(II) комплекса, Pt1–Pt4.....	85
5.2	¹ H MR спектроскопија Pt1–Pt4 комплекса	85
5.3	¹³ C NMR спектроскопија Pt1–Pt4 комплекса	87
5.4	UV-vis спектрофотометрија Pt1–Pt4 комплекса.....	87
5.5	IR спектроскопија Pt1–Pt4 комплекса.....	87
5.6	Рендгенска структурна анализа анхидрованог Pt3 комплекса.....	87
5.7	Стабилност комплекса Pt1-Pt4.....	89
5.8	Интеракције динуклеарних комплекса платине(II) са DNA	89
5.8.1	UV-Vis спектрофотометријска мерења.....	89
5.8.2	Флуоресцентна мерења	91
5.8.3	Мерења вискозитета	91
5.9	Интеракције мононуклеарних комплекса Pt(II) са говеђим серум албумином.....	92
5.10	<i>In vitro</i> антиканцерска активност комплекса Pt1-4	94
5.10.1	Pt3 комплекс смањује вијабилност ћелија мишјег карцинома дојке	94
5.10.2	Pt3 комплекс стимулише апоптотску смрт ћелија мишјег карцинома дојке ..	95
5.10.3	Pt3 комплекс смањује проценат ћелија које експримирају антиапоптотске протеине BclXL и Bcl-2.....	98
5.10.4	Pt3 комплекс повећава проценат ћелија које експримирају каспазу -3.....	100
5.10.5	Pt3 комплекс смањује пролиферацију ћелија мишјег карцинома дојке	101
5.10.6	Pt3 комплекс смањује миграцију ћелија мишјег карцинома дојке	102
5.11	<i>In vivo</i> антиканцерска активност комплекса Pt3	103
5.11.1	Pt3 комплекс смањује величину и волумен примарног тумора дојке	103
5.11.2	Новосинтетисани Pt3 комплекс не испољава токсичност	103
6	ЗАКЉУЧЦИ.....	106
7	ЛИТЕРАТУРА	108

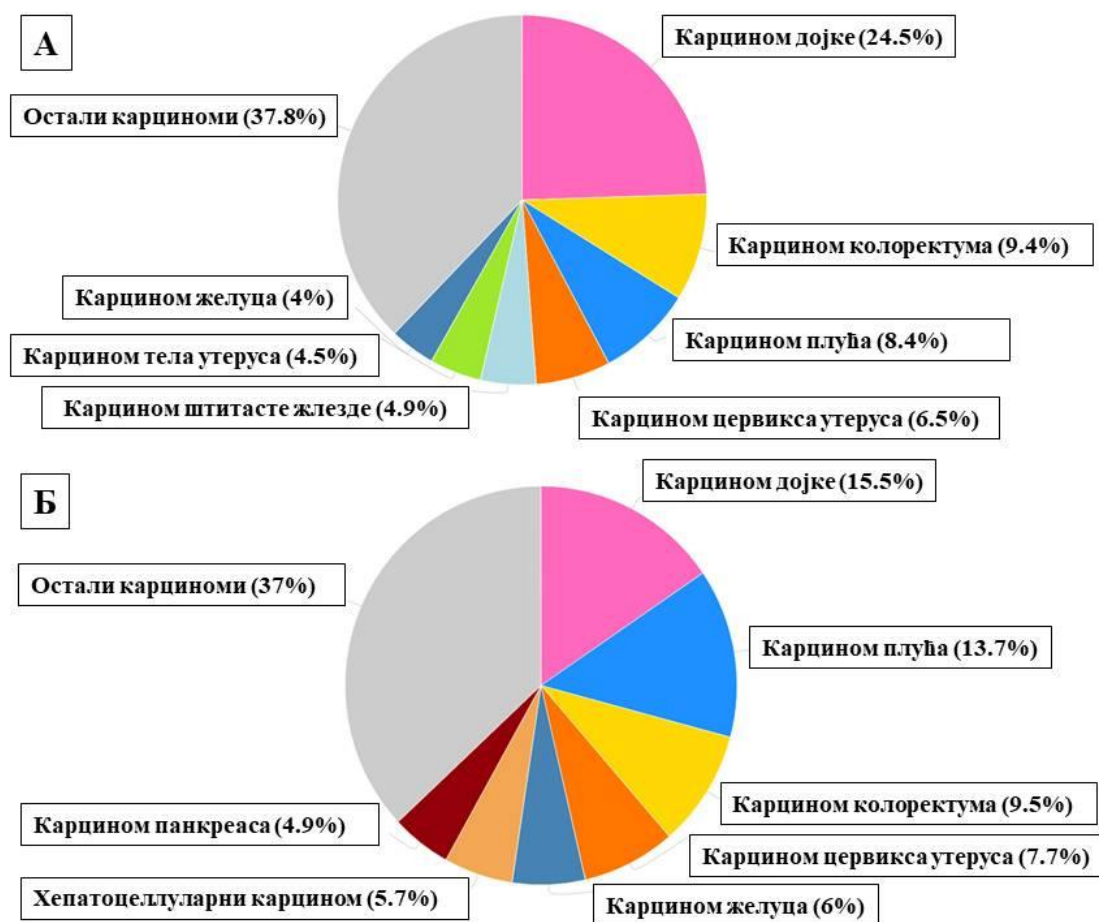
1 УВОД

Туморске ћелије се разликују од здравих ћелија, јер су дедиференциране, незреле, атипичне, анапластичне, сличне ембрионалним ћелијама. Туморска ћелија је неправилног облика, различите величине у односу на неизмењену ћелију. Цитоплазма је базифилна, некад изразито светла, а често и вакуолисана. Однос једра и цитоплазме се мења у корист једра. Једра су монструозна, хипертрофична, управо због повећаног метаболизма саме туморске ћелије. Положај једра није свуда исти, нарушава се поларизација. Хроматин се кондензује и неравномерно распоређује на периферији. Митозе су патолошке, мултиполарне, асиметричне и учестале. Бројењем патолошких митоза, одређује се митотски индекс (1). Туморске ћелије углавном имају висок митотски индекс, а цитоплазма не може да се подели истом брзином, па као резултат туморске ћелије поседују повећан број једара, кажемо да су вишеједарне. Мења се и број, изглед и величина нуклеолуса, једарца. Увећање једарца указује на малигну трансформацију ћелије и таква једарца означавамо као проминентна једарца (2). Мења се и мембрана туморске ћелије, услед чега се губи феномен контактне инхибиције, па ћелије прекомерно пролиферишу (3). Пролиферација туморских ћелија је аутономна и није контролисана постојећим регулаторним процесима ћелије. Туморске ћелије синтетишу факторе раста и активирају сигналне путеве укључене у контролу ћелијског циклуса (4). Туморске ћелије развиле су различите механизме којима избегавају имунски одговор. Један од важнијих механизма управо је инхибиција апоптозе- губитком регулаторних протеина или променом експресије молекула који поспешују или инхибирају апоптозу (5). Туморске ћелије пролиферишу непрестано захваљујући активности теломераза које играју улогу у одржавању стабилности теломера (6). Обзиром да непрестано пролиферишу, туморске ћелије имају и повећане енергетске потребе и тенденцију сталног повећања енергетских потреба, па се са прогресијом туморске болести, пупљењем, формирају нови крвни судови и тако повећава површина васкуларног корита (7, 8). Паралелно са процесима пролиферације одигравају се и процеси анаеробног метаболизма. У стањима хипоксије, туморске ћелије стварају енергију ферментацијом глукозе (7). Туморске ћелије додатно стимулишу ангиогенезу синтетишући ангиогенетске факторе (9). Инванзивност представља способност туморских ћелија да насељавају околна ткива и настаје због секреције ензима који разлажу протеине, дејства металлопротеиназа и губитка међућелијских веза, због чега туморске ћелије постају слободне и стичу способност метастазирања (10). Метастазирање је процес миграције туморских ћелија са места настанка примарног тумора, на друго место у организму (4).

1.1 Карцином дојке

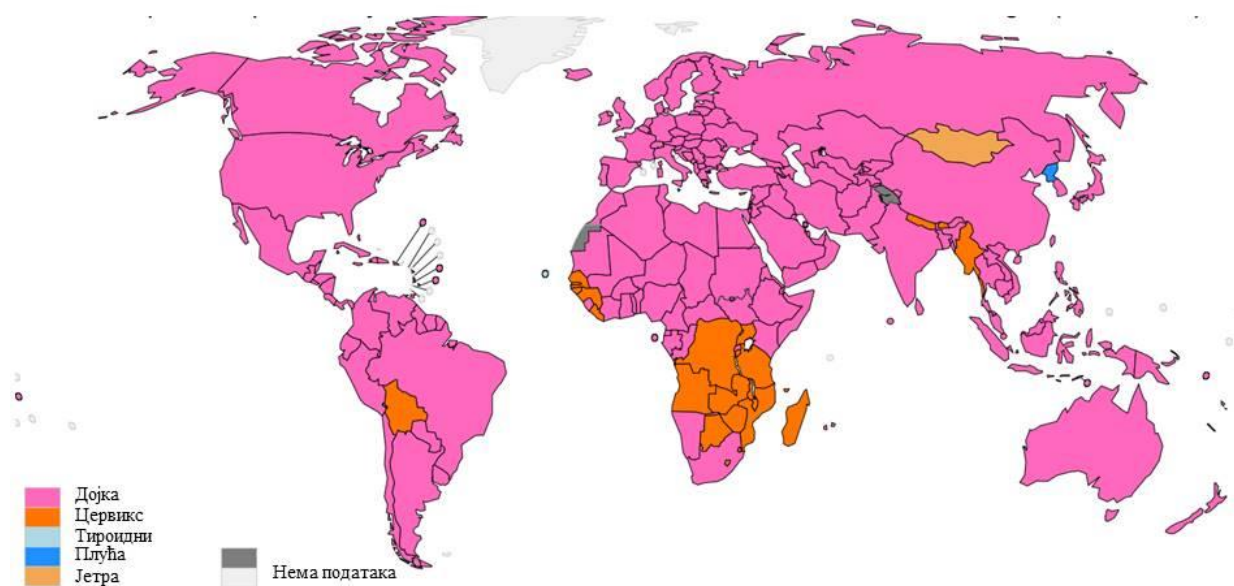
1.1.1 Епидемиолошке карактеристике карцинома дојке

Карцином дојке (лат. *Carcinoma mammae*) представља малигни тумор епителног порекла и најчешћи малигни тумор код жена широм света (Фигура 1) (11). Годишње се открије преко милион и по нових случајева у свету, а више од пола милиона годишње умре (12). Статистички, ризик од оболевања за карцином дојке износи 12,4%, тако да ће свака осма жена током живота оболети од карцинома дојке (13). Највећа учесталост карцинома дојке се региструје у западној Европи, северној Америци, Аустралији, Новом Зеланду и Аргентини. Овакву учесталост објашњава висока преваленца фактора ризика (Фигура 2) (14). У мање развијеним регијама субсахарске Африке, источне и јужне и Азије, али и Јапана, бележи се троструко мања инциденца оболевања од карцинома дојке (15). У Европи се, на водећем месту по инциденци оболевања од карцинома дојке, налазе земље западне, а затим северне Европе (16). Истраживања су показала да је карцином дојке, у популацији жена у Србији једно од најчешћих малигнутих обољења (13). Стандардизована стопа инциденце карцинома дојке према популацији света је 61.0 на 100 000 становника, а стандардизована стопа



Фигура 1. Стопа инциденце и морталитета за женску популацију у 2020. години. **А:** стопа инциденце карцинома; **Б:** стопа морталитета (Преузето из <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>)

морталитета према светској популацији, на 100 000 становника износи 19.8 (Фигура 1) (17). Најчешће се карцином дојке открива у стадијуму регионално проширене болести (18). Рана дијагностика и скрининг програми у САД и неким земљама Европе, омогућили су да се у чак у 70-80% случајева, карцином дојке дијагностикује пре него достигне пречник од 2 cm. У Србији се дијагноза карцинома у најранијем стадијуму поставља у мање од петине случајева. (19). Стога је повећање свести о факторима ризика и редовним контролама, данас, императив. Највећи број болесница у моменту дијагностиковања, налази се у раном стадијуму болести (I и II стадијум), затим у локално унапредовалој болести (III стадијум), али се карциноми дојке дијагностикују и у IV стадијуму када се детектују метастазе. Терапија зависи од клиничког стадијума. У складу са протоколима, као и увидом у опште стање болеснице, дефинише се вид терапије (20). Карцином дојке се у највећем броју случајева лечи хируршким путем. Други модалитети лечења укључују примену зрачне терапије и системску терапију која подразумева хемиотерапију, терапију хомонима и биолошку терапију (21). Савременије дијагностичке процедуре, као и



Фигура 2: Схематски приказ инциденце појединих типова карцинома у свету. (Преузето из <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>)

наведени модалитети лечења омогућавају успешније лечење и већу стопу преживљавања. Карциноми дојке дијагностиковани у I и II стадијуму болести, имају петогодишње преживљавање преко 92% (21).

1.1.2 Етиологија карцинома дојке

Бројни етиолошки фактори могу допринети развоју карцинома дојке (22). Утицај етиолошких фактора је синергички и кумулативан (22). Најзначајнији фактор ризика представља старосна доб, тако да се учесталост значајно повећава после 40. године и достиже пик око 60. године, када се учесталост почиње да смањује. У односу на узрасну доб, у Србији, највећа инциденца оболевања од карцинома дојке је између 55 и 65 година (23). На жалост, случајеви карцинома дојке нису реткост у млађој животној доби жене, у касним двадесетим годинама. Пол је такође битан фактор, особе женског пола 60-100 пута чешће оболевају, у односу на особе мушког пола (23). Трајање и природа репродуктивног периода у животу жене, такође су битни фактори који утичу на развој карцинома дојке. Ризик од развоја карцинома дојке вишеструко је повећан код жена које су прву менструацију добиле пре 12. године живота, жена које су ушле у период менопаузе пре 50. године и жена које нису рађале или су први пут родиле после 30. године. Употреба контрацептивних пилула наводи се као важан фактор који се повезује са карциномом дојке у млађем узрасту. Генетска предиспозиција, познати носиоци мутација гена BRCA 1 и BRCA 2 (енгл. *Breast cancer gene*, BRCA1, BRCA2) односно податак да је у породици неко од блиских сродника имао карцином дојке, такође се сматрају факторима ризика за оболевање од карцинома дојке (11). Постојање преканцерозних лезија такође, повећава ризик од оболевања. Преканцерозне лезије за карцином дојке су: атипична дуктална и лобуларна хиперплазија, интрадукталне пролиферативне лезије и *in situ* дуктални и лобуларни карцином (23). После 50. године живота опасност од карцинома дојке се повећава с гојазности и односом телесне тежине према висини. Жене које су оперисале карцином једне дојке, такође, имају повећан ризик да се карцином дојке развије у другој дојци. На развој карцинома дојке утичу и фактори ризика као што су: исхрана, конзумација алкохола, физичка неактивност и пушење (24). Значајан фактор ризика је и конзумирање висококалоричне хране, масне хране и протеина из меса, посебно код жена након менопаузе (25). Пронађена је позитивна корелација између конзумације алкохола и настанка карцинома дојке, кроз промену у генској експресији различитих сигналних путева (26). Етанол (0,06%) утиче на транскрипцију гена, а самим тим и на пролиферацију ћелија епитела млечних жлезда, индукцијом сигналног пута цитохрома СР450 ароматазе (хумани цитохром СYP19) због повећање активности естрогена (27). Изложеност јонизујућем зрачењу, посебно у млађих жена, повећава ризик од канцерогенезе (28). Радиотерапија као вид лечења карцинома дојке, повећава ризик за развој карцинома друге дојке (29). Различити ензимски системи превенирају, репарирају и коригују грешке на молекулу DNA (енгл. *Deoxyribonucleic acid*, DNA), настале током живота једне ћелије. Стрес се наводи као фактор који поспешује настанак мутација и последично стварање слободних кисеоничких радикала (30). Постоји податак да су жене с влажним церуменом склоније развоју карцинома дојке (31). Настанак карцинома дојке повезује се са генским мутацијама. Са друге стране, носиоци мутација не оболевају увек од карцинома дојке. У фази иницијације карцинома дојке, мутације гена p53 и мутације гена BRCA1 и BRCA2 играју кључну улогу. Поменути гени контролишу процес ћелијског раста и учествују у репарацији молекула DNA. Студије су показале да носиоци мутација за BRCA1 или BRCA2 гене, имају чак 85% више вероватноће да оболе од карцинома дојке до седамдесете године живота. Сматра се да

ген означен као BRCA1 одржава стабилност генома, учествује у механизмима поправке молекула DNA и процесу регулације ћелијског циклуса и транскрипције. Ген BRCA2 игра улогу у цитокинези и поправци једноланчаних и дволанчаних оштећења молекула DNA (32).

1.1.3 Клиничка презентација карцинома дојке

Главна манифестација карцинома дојке је безболан, чврст, фиксиран чвор у дојци различите величине (33). Већина жена сама палпира промену. Понекад промена може бити и болна на додир. Брадавица може бити уобичајеног изгледа, али је много чешће, увучена, тако да се не може извући. Крусте на брадавици су још једна манифестација карцинома дојке. Често постоји исцедак из брадавице, сукрвичав или крвав, ређе прозиран или замућен. Околна кожа може бити неизмењена, или црвена, натечена, са оспом или са улцерацијама, може да се перута, или да изнад саме промене има изглед поморанцине коре (33).

1.1.4 Макроскопске карактеристике карцинома дојке

Макроскопске карактеристике карцинома дојке зависе од хистогенетског порекла и хистолошког типа. Карциноми су најчешће сивкастобеличасте боје, звездастог облика, зракастих, нарецканих ивица, нејасно ограничени од околине (34). Просечно су величине 20-30 mm (8 до 88mm). У највећем броју случајева, чврсте конзистенције (гумасте- лобуларни карцином, желатинозне- муцинозни карцином) и ситнозрнасте површине пресека. Ређе су промене јасноограничене и мекане конзистенције. У пределу тумора, могу се уочити поља некрозе и поља крварења, посебно код папиларних и медуларних карцинома дојке (35). Макроскопски, филодни карциноми, експанзивно расту, достижу велике димензије, гумасте су конзистенције и релативно су јасно ограничени од околине (36). Најчешћа локализација карцинома дојке је горњи спољашњи квадрант. Карцином дојке може настати и у централном квадранту, субареоларно као и у било ком другом квадранту, у пределу брадавице или у аксиларном репу (37).

1.1.5 Микроскопске карактеристике карцинома дојке

Највећи проценат карцинома дојке настаје од дукталних епителних ћелија (у око 90%), ређе из лобуларног епитела (око 10%). Разликују се неинвазивни (*in situ*) и инвазивни (инфилтративни) карциноми дојке (38). Уколико је базална мембрана интактна, говоримо о неинвазивном, *in situ* облику карцинома дојке. Инвазивни типови карцинома дојке пенетрирају у околна ткива, регионалне лимфне чворове или имају способност да настане удаљена ткива у процесу метастазирања (39). Ако се узме у обзир хистолошки тип ћелија у којима се десила малигна алтерација, карциноми дојке се могу класификовати на дукталне, лобуларне, мешовите и ретке хистолошке подтипове у које спадају: медуларни, тубуларни, муцинозни тип, папиларни, карциноидни, аденоидоцистични, јувенилни, апокрини и сквамоцелуларни тип (34).

1.1.6 Патохистолошки типови карцинома дојке

Дуктални *in situ* карцином (лат. *Carcinoma ductale in situ*), DCIS (енгл. *Ductale carcinoma in situ*, DCIS), дојке чини око 15 до 25% свих карцинома дојке, у Србији 1 до

3%. Представља пролиферацију малигнух ћелија унутар епитела дуктуса, без знакова пробијања базалне мембране и инвазије строме (40). Разликује се више архитектурних облика: папиларни интрацистични, микропапиларни, крибриформни, солидни, *comedo* и мешовити тип. *Comedo* и микропапиларни облик спадају у најинвазивније облике, док је мешовити тип најзаступљенији, са око 50-60% учесталости (40).

Лобуларни карцином *in situ* (лат. *Carcinoma lobulare in situ*), LCIS (енгл. *Lobular carcinoma in situ*, LCIS), локализује се у терминалној дуктално-лобуларној јединици. Учесталост појаве лобуларног карцинома *in situ* износи 2 до 3%, а у дојкама са инвазивном формом карцинома и до 20%. Обично настаје у четвртој деценији живота и карактерише се мултицентричношћу и билатералним промена. Забележени су случајеви регресије тумора после менопаузе. Хистолошки, лобуларни карцином *in situ* чине увећани дилатирани ацинуси и дуктуси, лумена потпуно испуњеног малигнуим ћелијама, које имају тенденцију ширења у веће, екстралобуларне дукталне формације, мењајући уобичајен епител дуктуса. Митозе су ретке, нуклеарна и ћелијска атипичност нису изражене, тако да нема цитолошких критеријума који би указали на могући инвазивни потенцијал (41).

Инвазивни карцином дојке се најчешће јавља. Инвазивни карцином дојке дели се на дуктални инвазивни карцином (лат. *Carcinoma ductale invasivum*), IDC (енгл. *Invasive ductal carcinoma*, IDC) у 80-90% случајева и лобуларни инвазивни карцином дојке (лат. *Carcinoma lobulare invasivum*), ILC (енгл. *Invasive lobular carcinoma*, ILC) са учесталошћу до 12%. Оба типа настају из терминалних дуктуло-лобуларних јединица (42). Посебан тип карцинома дојке са кутаним манифестацијама око брадавице, означава се као *Paget*-ова болест. Обично се открива због измене текстуре и боје саме брадавице (43). Папиларни карцином има инциденцу појављивања мању од 3%, док се муцинозни подтип среће још ређе и чини око 1,8% свих карцинома дојке (44).

Типови инвазивних карцинома дојке су:

- Дуктални
- Лобуларни
- Медуларни
- Муцинозни
- Тубуларни
- Папиларни
- Јувенилни
- Аденоидцистични
- Сквamoцелуларни
- Апокрини и
- *Paget*-ова болест
- Инфламацијски карцином

Дуктални инвазивни карцином (лат. *Carcinoma ductale invasivum mammae*) представља најучесталију форму карцинома дојке са учесталошћу од око 75 до 80% свих карцинома дојке (45). Паренхим тумора граде туморске ћелије распоређене у плаже, траке и гнезда, тубуларне и формације налик жлездама. Строма се састоји од везивних ткива и крвних судова. Горње спољашњи квадрант представља место најчешће локализације. Обично се манифестује као нејасно ограничен чвор величине 20mm до 50mm који захвата околно ткиво, набира кожу и повлачи брадавицу (45).

Постоје два подтипа дукталног инвазивног карцинома (35):

- тип без посебних карактеристика који обухвата скирусне (лат. *Carcinoma scirrhosum*) и *comedo* карциноме дојке и

- тип са посебним карактеристикама који садржи поља лобуларне, муцинозне, светлоћелијске диференцијације и обухвата тубуларни, медуларни, колоидни, метапластични, аденоцистични и папиларни карцином.

Митотски индекс је варијабилан као и једарни полиморфизам, од умерено израженог до наглашеног (46). У туморским ћелијама се у фокусима могу уочити и поља апокрине и сквамозне метаплазије (34). Туморско ткиво инфилтрише околно масно ткиво, периваскуларне и перинеуралне просторе и лимфатике. Обично даје метастазе у лимфне чворове аксиле и медијастинума, а путем крвних судова у плућа, кости, мозак и јетру (47).

Лобуларни инвазивни карцином (лат. *Carcinoma lobulare invasivum mammae*) дојке је ређи облик карцинома са учесталошћу од око 5 до 10%. Захвата један или више лобулуса, при чему су ацинуси лумена, потпуно испуњени малигним ћелијама. Туморске ћелије су округласте, униформне, крупнијих једара, често са проминентним нуклеолусима, без изражене ћелијске атипичности. Ћелије могу бити распоређене у низове, у концентричне кругове око дуктуса или бити разбацане по богатој строми тумора. Обично настаје у популацији млађих жена, карактерише се високом експресијом рецептора за естроген, а промене су мултицентричне и билатералне. Разликују се алвеоларни, солидни, тубуло-лобуларни и класични подтип лобуларног карцинома дојке (48).

Медуларни карцином (лат. *Carcinoma medullare mammae*) чини око 2% свих карцинома дојке. Назив је добио по доминантно развијеној паренхимској компоненти тумора, коју граде слабодиферентоване, крупне ћелије, везикуларних једара са проминентним једарцима, а карактерише се и богатом лимфоцитном инфилтрацијом (49).

Тубуларни карцином (лат. *Carcinoma tubulare mammae*) има инциденцу појављивања од свега 2%. Доминантно се састоји од тубуларних структура, обложених једноредним цилиндричним епителом, малигних цитолошких карактеристика, без једарне и ћелијске атипичности (49).

Папиларни карцином (лат. *Carcinoma papillare mammae*) је изграђен од папиларних формација обложених малигним ћелијама, са оскудном фиброваскуларном стромом (49).

Paget-ова болест је ретка, кутана форма карцинома дојке, обично са локализацијом на брадавици, а често са захватањем ареоле (43).

Инфламацијски карцином (лат. *Mastitis carcinomatosa*) је још једна веома ретка форма карцинома дојке, са брзим напредовањем, генерализацијом и дисеминацијом у виталне органе и брзим леталним исходом, у чијој се основи налази емболизација лимфатика захваћене коже (50).

У клиничкој пракси најзначајнија је подела карцинома дојке базирана на експресији три протеинска рецептора, који су најважнији биолошки маркери прогнозе и дефинисања терапије (51). Неизмењене и малигне ћелије дојке експримирају рецепторе за хормоне, естроген (енгл. *Estrogen*, ER) и прогестерон (енгл. *Progesterone*, PR) и факторе раста од којих је најважнији: рецептор за хумани епидермални фактор раста, HER-2 (енгл. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER-2). Експресија ER, PR, HER-2 може бити повећана, смањена или се може потпуно изгубити (52). На основу експресије поменутих рецептора карциноми дојке се деле на:

- Хормон зависне - који увек експримирају ER, PR, уз варијабилну експресију HER-2.
- Троструко-негативне карциноме који не експримирају ни један од поменутих рецептора.

Троструко-негативни карциноми дојке (енгл. *Triple Negative Breast Cancer, TNBC*) се карактеришу одсуством експресије рецептора за естроген, прогестерон и хумани епидермални фактор раста. Веома су агресивни, лоше реагују на терапију и самим тим су и најлошије прогнозе (53). Највећи број карцинома дојке појачано експримира рецепторе за ER (око 75%), док је око 65% карцинома дојке са појачаном експресијом за PR. За разлику од троструко-негативних, карциноми дојке који имају рецепторе за поменуте хормоне (ER+/PR+) у 60% случајева имају повољан одговор на терапију. Тумори чије ћелије не поседују рецепторе за ER и PR (ER-/PR-) одговарају на терапију у свега 5-10% случајева (54).

Поменути типови карцинома дојке се разликују и по својим особинама, по биолошком понашању и прогнози. Више од 2/3 свих дијагностикованих карцинома дојке спада у хормон зависне туморе и позитивно је бар на један од стероидних рецептора. Подела на хормон зависне и TNBC је најближа молекуларној класификацији, те се у интернационалној клиничкој пракси и користи најчешће (54).

1.1.7 TNM класификација карцинома дојке

TNM класификација је међународно прихваћени стандард за дефинисање стадијума малигне болести, заснован на анатомским карактеристикама примарног тумора: величини тумора (T), степену захваћености регионалних лимфних чворова (N) и присуству метастаза (M). Стадијум туморске болести представља индикатор прогнозе, али и све важнију компоненту у праћењу и контроли карцинома дојке (55).

1.1.8 Клинички стадијум болести

Клинички стадијум болести се дефинише на основу TNM класификације и представља одредницу за одговарајуће лечење и прогнозу. T1 стадијум - тумори величине до 20mm, T2 величине 20 до 50 mm, T3 преко 50mm, T4 стадијум - тумори било које величине који инфилтришу кожу. Статус лимфних чворова означава се са N0,1,2 и 3. N0 када нема позитивних лимфних чворова; N1 кад се метастатски депозити нађу у 1-3 лимфна чвора; N2 ако се метастатски депозити нађу у 3-6 лимфних чворова и N3 ако је 6 и више лимфних чворова са метастазама (55). Стадијум туморске болести се дефинише након евалуације критеријума за T, N и M компоненту и класификује као 0 стадијум (*in situ* карцином) до IV стадијума који се карактерише присуством удаљених метастаза. Клинички стадијуми I, II и III су подељени на подстадијуме: IA, IIB, IIIC. Стадијум туморске болести је уједно и важан предиктор прогнозе карцинома дојке (56). Поред тога, стадијум туморске болести представља све важнију компоненту у евалуацији програма превенције настанка карцинома дојке, праћењу туморске прогресије и контроли малигне болести (57). Обзиром да су карциноми дојке веома хетерогени, јавила се потреба за прецизнијим дефинисањем типа и подтипа карцинома што се реализује додатном дијагностиком на основу образаца експресије појединих маркера (58).

1.1.9 Молекуларна субкласификација карцинома дојке

На основу литературних података карциноме дојке можемо поделити и на следећи начин (59):

- **HER-2** позитивни тумори високо експримирају HER-2, а истовремено ниско експримирају ER-/ PR-, имају висок хистолошки градус, висок митотски индекс и изражену способност метастазирања (60).
- **Луминал А** (ER+/PR+, HER-2 негативни, а митотски индекс је низак) најповољније прогнозе и **луминал Б** (ER+/PR+, HER-2 негативни, уз висок митотски индекс) лошије прогнозе од луминал А типа (60).
- Тумори слични нормалном ткиву (енгл. *normal breast-like tumors*) имају профил експресије као и здраво ткиво дојке и само су ER и PR позитивни (51).
- **BL** (енгл. *Basal Like, BL*), тумори су обично негативни на ER, PR, HER-2, високог су градуса, имају висок митотски индекс и по правилу су лоше прогнозе (61). У литератури се BL тип, поистовећује са TNBC туморима дојке. Ипак, иако је већина троструко-негативних тумора у исто време и BL и обрнуто, не могу се потпуно изједначити (61).
- **Клаудин** ниски тумори не експримирају или веома слабо експримирају адхезивне протеине и типичне маркере диференцираних луминалних ћелија, а истовремено високо експримирају маркере епителијално-мезенхимске транзиције (енгл. *Epithelial-mesenchymal transition, EMT*) (62). Велика већина тумора из категорије клаудин ниских тумора припада троструко негативним туморима (63).

1.1.10 Хистолошки градус тумора

Хистолошки градус означава хистолошку диференцијацију, односно степен сличности са неизмењеним ткивом и сразмерен је степену ткивне и ћелијске атипичности. Дефинише се на основу микроскопских карактеристика туморских ћелија (анаплазије, ћелијског и једарног полиморфизма, хиперхромазије једара). У клиничкој пракси карциноми дојке се поред TNM класификације, деле и на основу хистолошког градуса (64). Хистолошки градус или степен диферентованости тумора показује колико ћелије тумора наликују на ћелије од којих воде порекло. По хистолошком градусу разликујемо малигне туморе дојке који су добро диферентовани, умерено или слабо диферентовани. Што је хистолошки градус виши то је тумор агресивнији и лошије је прогнозе. Хистолошки градус тумора представља параметар којим се адекватније процењује прогноза карцинома дојке и оптимизује терапијски приступ (34). Пролиферацијски потенцијал се изражава кроз експресију Ki-67, пролиферацијског индекса, односно кроз присуство или одсуство патолошких митоза, плеоморфних ћелија и ћелија са хиперхроматичним једрима. Степен диференцијације туморских ћелија је морфолошки показатељ агресивности тумора и изражава се кроз способност туморских ћелија да формирају тубуларне формације (64). Најчешће се у клиничкој пракси користи *Nottingham* систем градирања карцинома дојке (65), где се градус израчунава евалуацијом: процента заступљености тубуларних структура, нуклеарног полиморфизма и митотског индекса. Свака од карактеристика скорира се од 1-3. Сабирањем скорова добија се укупни градус скор који се креће у опсегу од 3 до 9, на основу кога се даље дефинише градус тумора:

Градус I: (укупни скор 3, 4 или 5) за добро диферентоване туморе са ниским пролиферацијским индексом и добродиферентованим туморским ћелијама (без

израженог једарног и ћелијског полиморфизма са највише 1 митозом у једном пољу великог увеличања- 1М/1НРФ).

Градус II: (укупни скор 6 или 7) за умерено диферентоване туморе, са ниским пролиферацијским индексом, ниским степеном диференцијације или туморе са високом пролиферацијском компонентом и добром диференцијацијом туморских ћелија (полиморфизам средњег степена и број митоза 2М/1НРФ).

Градус III: (укупни скор 8 или 9) – за слабо диферентоване туморе, са ниским пролиферацијским индексом а ниским степеном диференцијације туморских ћелија (изражена ћелијска и нуклеарна атипичност и број митоза преко 3М/1НРФ).

Хистолошки градус је прогностички фактор и за укупно преживљавање, за пацијенте са позитивним али и за пацијенте са негативним статусом лимфних чворова (66). Пацијенти са нижим хистолошким градусом обично имају боље преживљавање, док виши хистолошки градус може указати на бољи учинак хемиотерапије код пацијената. Уочивши да изглед једра у малигној ћелији не прати увек степен диференцијације, уведен је опис једара као критеријум за диференцијацију.

1.1.11 Нуклеарни градус тумора

Изглед једра малигнућ ћелија дефинише нуклеарни градус и то:

Градус I- униформна једра, правилног облика неприметног јадарца, са ретким митозама.

Градус II- нејасно дефинисан градус, између градуса 1 и 3.

Градус III- једра неправилног облика и величине са наглашеним једарцима, кондензованог хроматина и бројне митозе.

Ипак, највећи прогностички значај има комбинација фактора као што су: статус лимфних чворова аксиле, величина тумора и хистолошки градус (67).

Повезивање стадијума болести са хистолошким градусом тумора, може предвидети евентуални релапс болести. Тако су пацијенти са најмањим ризиком - пацијенти са туморима мањим или до 2 cm, без метастаза у лимфним чворовима аксиле и хистолошког градуса I. Пацијенти са највећим ризиком су пацијенти са туморима већим од 5cm, са метастазама у четири или више лимфних чворова и хистолошког градуса III.

Примарно операбилни пацијенти са карциномом дојке најчешће се сврставају у хистолошки градус II (68). Када је у питању прогноза ових пацијената, обзиром на недовољну поузданост прогностичког значаја хистолошког градуса тумора, предложена је употреба додатних маркера – биохемијских фактора прогнозе тока болести.

1.1.12 Пuteви ширења карцинома дојке

Ћелије карцинома дојке метастазирају лимфогеним и хематогеним путем (69). Како су први на путу дренаже лимфе аксиларни лимфни чворови, управо се најчешће регионалне метастазе карцинома дојке виђају у лимфним чворовима аксиле. Регионалне метастазе подразумевају и „позитивне“ (лимфне чворове са метастатским депозитима) унутрашње мамарне и супраклавикуларне лимфне чворове (70). У више од половине случајева карцинома дојке, у моменту постављања дијагнозе већ постоје регионалне метастазе. Поред регионалних, код карцинома дојке могу се развити и удаљене, хематогене метастазе, у плућима, на плеури, у надбубрезима, јетри, костима, кожи и мозгу (71).

1.1.13 Клиничка дијагностика карцинома дојке

Дијагностиковање карцинома дојке, поред клиничког прегледа, треба допунити додатним дијагностичким процедурама. Иницијално се по постављању сумње о постојању малигне болести спроводе неинвазивне визуализационе методе попут ултразвука, мамографије и магнетне резонанце. Ултразвучна дијагностика као неинвазивна метода, користи се за визуализацију тумора али и визуализацију лимфних чворова. Након ултразвуком верификоване промене приступа се аспирационој биопсији, *core* биопсији, након које се поставља индикација о оперативном лечењу. Дефинитивну дијагнозу поставља патолог на основу микроскопске анализе. Након операције, на оперативном материјалу, патолог одређује хистолошки тип и подтип карцинома дојке, као и патолошки стадијум тумора. За дефинисање раширености малигне болести, потребно је урадити и радиографију плућа, ултразвук абдомена, понекад компјутеризовану томографију, мамографију, рендгенски снимак аксијалног скелета или сцинтиграфију скелета како би се верификовала или искључила системска дисеминација болести (72). Мамографија дијагностикује карцином дојке са специфичношћу и сензитивношћу од чак 90%. Мамографски се карцином дојке презентује као дводимензиона промена, ексцентричних и ирегуларних зракастих ивица (73). Сумарно, фактори који дефинишу прогнозу карцинома дојке су величина тумора, статус лимфних чворова, хистолошки градус и присуство хормонских рецептора (74). Прогностички фактори не говоре само о степену агресивности тумора, већ се комбинују и групишу на различите начине са циљем да се продужи укупно преживљавање и побољша квалитет живота. Најзначајнији прогностички фактор је рано постављање дијагнозе (75).

Прогностички критеријуми за карцином дојке су многобројни (76):

- инвазивност као способност малигних ћелија да се одвоје од примарног тумора и пробију базалну мембрану и инфилтришу дубље слојеве и узрокују деструкцију околног ткива,
- хистолошки тип и подтип,
- хистолошки градус,
- нуклеарни градус,
- митотски индекс (пролиферацијски индекс, Mib1, топоизомераза 2 α),
- стадијум туморске болести,
- ангио, лимфна и перинеурална инвазија,
- дезмоплазија и перидуктална еластоza (као маркери добре прогнозе),
- некроза (одсутна, минимална, изражена),
- стромална моноклеарна реакција (као добар прогностички знак),
- захваћеност коже брадавице, пекторалног мишића и зида грудног коша,
- хормонски статус (експресија рецептора за естроген, прогестерон и Bcl2),
- експресија других маркера (HER-2, p53, p21, *cathepsin D*, Ki-67)

1.1.14 Патохистолошка испитивања карцинома дојке

Патохистолошки налаз је прекретница за даљи третман у погледу избора терапијског модалитета и прогнозе карцинома дојке. Патохистолошки налаз дефинише хистолошки тип, нуклеарни градус, степен малигности, захватање околних ткива, лимфних и крвних судова и лимфних нодуса. Патохистолошким налазом се још дефинише стадијум туморске болести (TNM), удаљеност тумора од ивица ресекције, захваћеност

васкуларне мреже, лимфатика или нерава. Такође се одређују резидуални статус тумора и степен регресије тумора (*Miler&Payne* градус). Наведени фактори, према америчком Националном институту за карцином, диктирају прогнозу туморске болести (77).

Дојке су осетљиве на деловање хормона, те стога током живота жене трпе промене у складу са цикличним хормонским променама. У пубертету под дејством естрогена пролиферише жлездани епител дојке. Пролиферација се наставља и у трудноћи, са циљем да припреми дојке за будућу производњу млека. Јасно је да ће само тумори са рецепторима за поменуте хормоне, позитивно реаговати на хормонску терапију (78).

1985. године, откривен је рецептор за HER-2 или erb-B2/neu протеин, протоонкоген, регулатор ћелијског раста и пролиферације са активношћу тирозин киназе (79). Ген који кодира синтезу поменутог протеина смештен је на 17. хромозому. У физиолошким условима постоје две копије HER-2 гена, док у случају карцинома дојке настају мултипле копије које за последицу појачавају синтезу протеина, експресију на површини ћелије, мењајући на тај начин деобу ћелије и пролиферацију, омогућавајући тако неконтролисан раст, што је у основи туморогенезе. Тумори који појачано експримирају HER-2 рецепторе, расту брже, мање реагују на хемио и хормонску терапију и обично су веома агресивни (80). Породицу рецептора за HER-2 чине четири мембранска протеина: HER-1, HER-2, HER-3 и HER-4. Структурално, рецептори се састоје из три домена- екстрацелуларног за везивање лиганда, хидрофобног, трансмембранског дела у коме се рецептор везује за ћелијску мембрану и интрацелуларног дела са активношћу тирозин киназе. У интактном стању су мономери. Везивањем лиганда и активацијом рецептора настаје -хомо и хетеродимеризација, активација ензима тирозин киназе, када се активира каскадни механизам промена у самој ћелији што покреће пролиферацију, апоптозу, ангиогенезу, промену адхезивности и мотилитета ћелије (81).

Основна палета имунохистохемијских бојења подразумева детекцију ER, PR, HER-2 рецептора и пролиферацијског индекса Ki-67 (*cut off* 14%). Проширена палета има значаја у диференцијалној дијагностици и подразумева бојења на *vimentin* (за разликовање карцинома од саркома), *e-cadherin-a* (за разликовање дукталног од лобуларног карцинома), калретинина, SMA (енгл. *smooth miosin actin*), колаген тип IV, *kalponin (in situ carcinoma)*, GATA 3, *mamtaglobin* (за доказивање примарног порекла), CK5/6, CK 8 (за разликовање малигних од бенигних лезија), CK7, CK18, CK19, EMA, *lactalbumin*, S-100, p63, *katepsin D* (CTSD) (82).

Основна метода за одређивање статуса HER-2 рецептора је имунохистохемијска метода. За детекцију појачане експресије (*overexpression*) HER-2 рецептора користи се *in situ* хибридизација коришћењем флуоресценције (енгл. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) или хромогена (енгл. *chromogenic in situ hybridization*, CISH), посебно у млађих жена, када се коришћењем анти -HER-2 антитела јасно одвајају негативни (0 или 1+), гранични и јасно позитивни (скор 3+) карциноми (83, 84).

1.1.15 Ћелијске линије у истраживањима карцинома дојке

Ћелијске линије представљају изоловане ћелијске популације које се могу гајити у лабораторијама. Разликујемо адхерентне ћелијске линије чије се ћелије лепе за подлогу на којој се гаје или неадхерентне које за своје преживљавање не захтевају везу са подлогом или другим ћелијама. Генетски су идентичне, хомогене или хетерогене. Уколико су ћелије директно изоловане из ткива означавају се као примарне културе и обично су кратког животног века (85). Изолују се из крви и ткива тумора, механичким путем, филтрирањем или ензимском разградњом колагеназама и трипсином. Ћелије

примарних култура имају ограничен потенцијал деобе, па је најбоље експерименте реализовати одмах после изолације ћелија (86). Имортализоване линије ћелија имају неограничену способност пролиферације, што се постиже намерним мутацијама или одређеним модификацијама гена који регулишу пролиферацију. Ћелијске линије чувају се у „банкама ћелија“. Свака ћелијска линија поседује спецификацију о изолацији, типу, начину чувања, начину третирања. Једна од најчешће коришћених колекција, уједно и најпознатија је АТСС колекција (енгл. *The American Type Culture Collection*, АТСС), а затим ЕСАСС колекција (енгл. *The European Collection of Animal Cell Cultures*) (87).

1.1.16 Мишји модел карцинома дојке

Карцином дојке на анималном моделу најчешће се индукује помоћу туморске линије 4Т1. *Miller* и сарадници су туморску линију 4Т1 изоловали из тумора дојке миша соја BALB/с, који је настао спонтано (88, 89). Малигне ћелије се апликују директно у масно јастуче млечне жлезде, у респну вену, катетеризацијом десне каротидне артерије или у леву срчану преткомору. Апликацијом малигну ћелију директно у млечну жлезду, туморске ћелије најбрже почињу да расту и после 7. дана након апликације могуће је палпирати примарни тумор дојке. Клинички тумор дојке миша, одговара IV стадијуму хуманог карцинома дојке. Уз то, метастазе се веома брзо развијају, обично од 3. до 6. недеље од индукције болести, што скупа овај модел чини веома погодним за истраживања. Метастазе тумора дојке развијају се у плућима, затим у јетри, костима и мозгу и то су углавном хематогене метастазе (90-92). Студијама је потврђено да ћелијска линија 4Т1 метастазира и лимфогеним путем, мада знатно ређе, до регионалних и удаљених лимфних чворова (93).

На анималном моделу карцинома дојке метастазе се прво појављују у плућима (почев од 7. дана, па надаље, зависно од броја туморских ћелија које су апликоване), нешто касније у јетри (од 21. до 28. дана) и најкасније у мозгу, оквирно после 35. дана од апликовања туморских ћелија (94). Метастазе у мишјем моделу карцинома дојке показују дистрибуцију као у хуманом карциному дојке. Употреба 4Т1 ћелијске линије се карактерише способношћу спонтаног метастазирања у кости (89, 93). Такође, појава метастаза у многоне зависи и од начина апликације туморских ћелија. Показано је да ћелије апликоване интравенски знатно брже дају метастазе него туморске ћелије апликоване субкутано. Метастатски потенцијал као и брз раст примарног тумора, чине анимални модел карцинома дојке одличним моделом за проучавање карцинома дојке. Описани модел је погодан и за истраживање имунског одговора у процесу раста тумора и метастатској фази карцинома, обзиром да је линија 4Т1 сингена за мишеве соја BALB/с (93).

Линија туморских ћелија 4Т1 појачано експримира маркере епителних тумора, поједине транскрипционе факторе али и гене који кодирају синтезу протеина који учествују у међућелијској адхезији (клаудин, кадхерин), што је чини погоднијом за истраживања у односу на друге неметастатске линије туморских ћелија. Такође, појачана експресија металопроотеиназа матрикса (Mmp-3,9 и 13) указује на могућност ремоделовања екстраћелијског матрикса и објашњава брзу појаву метастаза (95). Карактеристично за ћелијску линију 4Т1 је низак ниво цикллина G (Ccn1), протеина Cdk2-1, инхибитора цикллин зависне киназе p21 (Cdkn1a) и p53, што за последицу има убрзавање ћелијског циклуса (G1 → S) и инхибицију ћелијског одговора на оштећење DNA (93).

1.1.17 Лечење карцинома дојке

Лечење карцинома дојке спроводи се према јасно дефинисаним протоколима и зависи од стадијума туморске болести. Основна терапија је хируршка, након чега се ординирају адјувантна хемиотерапија, терапија хормонима и зрачна терапија. Избор терапије зависи од стања пацијента, прогностичких фактора, али и предиктивних фактора карцинома дојке и строго је индивидуалан (21).

1.1.17.1 Хирургија инвазивног карцинома дојке

У I и II клиничком стадијуму карцинома дојке, хируршко лечење примарног карцинома дојке, спроводи се са или без неоадјувантне терапије. Операција има за циљ да уклони туморско ткиво (туморектомија или мастектомија) и метастатске депозите у аксиле када се ради дисекција аксиле (96).

Најпожељније су поштедне операције малигног тумора дојке (енгл. *Breast Conservation Surgery*, BCS; *Breast Conservation Therapy*, BCT) када се уклања тумор, али и околно здраво ткиво. Синоними за ову врсту хируршке интервенције су: лампектомија, сегментектомија, туморектомија, парцијална ресекција или квадрантектомија. Након поштедних оперативних захвата, обавезна је постоперативна радиотерапија дојке (97).

Код класичних радикалних оперативних захвата (мастектомија), уклања се дојка у целини уз пратећу дисекцију аксиле. Разликује се неколико врста мастектомија: проста, модификована радикална, радикална, поштедна са очувањем коже и мастектомија са пластиком дојке (98).

Поштедна операција карцинома дојке показује сличне резултате преживљавања као и мастектомија, а свакако се лакше подноси од мастектомије (99).

Осим оперативних техника у процесу лечења карцинома дојке користе се још и радиотерапија, хемиотерапија, ендокрина и циљана терапија (21).

1.1.17.2 Радиотерапија

Радиотерапија или зрачна терапија је метода лечења када се употребом јонизујућег зрачења или радиоактивних изотопа, узрокује оштећење молекула DNA, стварање реактивних облика кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS) и последична деструкција туморских ћелија. Најчешће се радиотерапија дојке спроводи након поштедне операције карцинома, чиме се смањује ризик од рецидива тумора у дојкама (100).

1.1.17.3 Хемиотерапија

Хемиотерапија подразумева пероралну или интравенску примену неког од конвенционалних цитостатика, попут једињења из групе антрациклина, антифолата, таксана, или платинских деривата, који интензивно делују на ћелије у пролиферацији. Хемиотерапеутици нису селективног деловања па тако осим што делују на туморске ћелије, делују и на здраве ћелије организма, посебно на ћелије костне сржи, епидермиса коже и ћелије покривног епитела дигестивног тракта (101).

1.1.17.4 Ендокрина терапија

Ендокрина терапија има за циљ да уклони изворе естрогена или да спречи његово деловање и ефикасна је само код хормон зависних тумора. Најчешће коришћен медикамент у ендокриној терапији карцинома дојке је тамоксифен (102).

1.1.17.5 Биолошка терапија

Циљана или биолошка терапија представљају селективне методе лечења и методе са најмањим степеном токсичности јер делују искључиво на одређене рецепторе и ензимске системе карактеристичне само за туморске ћелије (103). Подразумева примену моноклонских антитела и малих молекула. Најчешће коришћено моноклонско антитело у клиничкој пракси је херцептин, који блокира HER-2 (81). У конвенционалној употреби су и мали молекули, попут лапатиниба који инхибира, HER-2 али и EGFR који се понашају као инхибитори тирозин киназа (104). На жалост, примена поменутих моноклонских антитела и малих молекула ограничена је само на туморе који експримирају HER-2 рецепторе. У случају такозваних троструко негативних тумора, једини вид системске терапије је хемиотерапија. Пацијенти са TNBC, након примене хемиотерапије, имају лошије укупно преживљавање у односу на хормонски зависне карциноме дојке, веома често су резистентни на хемиотерапију, па су и могућности за лечење ограничене (105).

1.1.17.6 Електропорација

Упркос развоју медицине, малигни тумори дојке представљају значајан узрок смрти у свету те стога постоји оправдана тежња да се пронађу ефикаснији начини за лечење. Нов начин лечења могла би бити електропорација или електропермеабиланизација (106). Метода подразумева краткотрајно излагање ткива напонским импулсима високе амплитуде, које стварају електрично поље и омогућавају појачан транспорт молекула и јона у ћелију (107). У зависности од способности ћелије да интегритет ћелијске мембране и њену функцију, врати на првобитно стање, електропорација може бити ирверзибилна или реверзибилна. Метода ирверзибилне електропорације омогућила би лечење до сада неоперабилних карцинома, када се ћелија практично уводи у ћелијску смрт, а притом не ледира здраво ткиво околине, што значајно скраћује опоравак пацијента и смањује укупни морталитет (108, 109).

1.1.17.7 Друге методе лечења

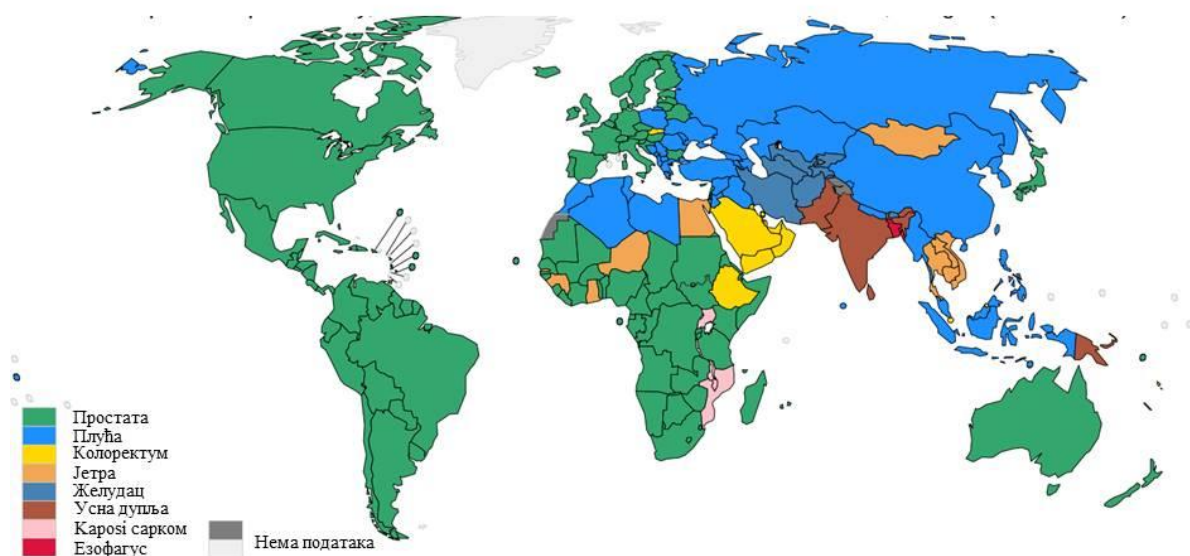
Поред класичних метода лечења карцинома дојке, користе се и друге методе попут микроталасне, радиофреквентне или криоаблације. Поменуте методе представљају локалне методе лечења карцинома, онда када се операција не препоручује (110). Електропорација узрокује некрозу и апоптозу туморских ћелија (111). Најпожељнији ефекат терапије карцинома свакако је индукција апоптозе. Локалне методе су такође пожељни видови лечења, јер не ледирају ткиво околине, али код којих се услед јачине електричног поља, броја пулсева, трајања, може развити и некроза (111). Реверзибилна електропорација комбинована са хемиотерапијом резултирала је развојем електрохемиотерапије за лечење солидних тумора (112). Електрохемиотерапија представља методу селективног лечења карцинома дојке, када се употребом електричног поља повећава апсорпција хемиотерапеутика у ткиво тумора, а самим тим и цитотоксичност.

Сходно томе, укупна доза поменутих агенаса може се значајно смањити чиме би се избегла и појава нежељених реакција на дати антинеопластични агенс (113). Захваљујући електропермеабилитацији ткива, хемиотерапија може постати локална метода за селективно лечење тумора (114).

1.2 Колоректални карцином

1.2.1 Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома

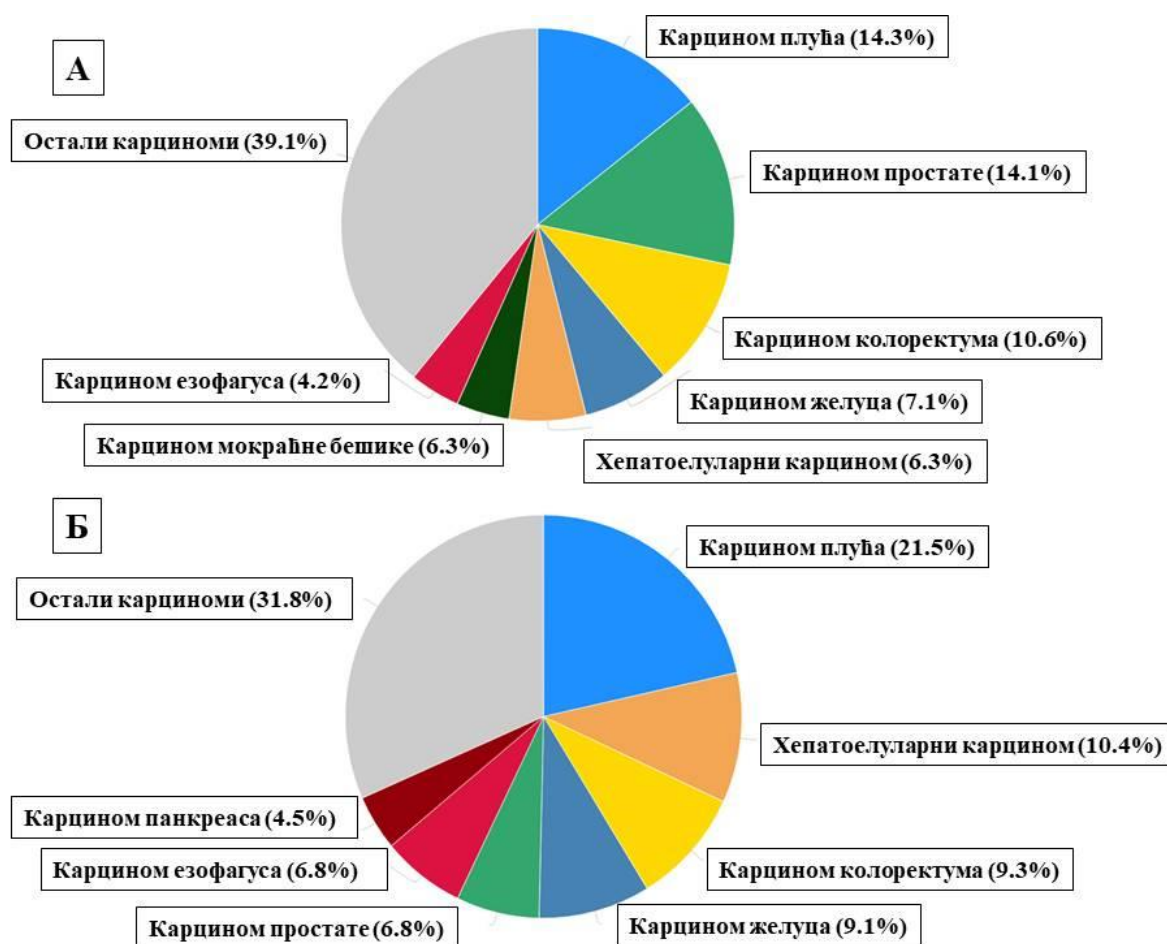
Карцином завршног дела дебелог црева је малигни тумор епителног порекла и представља један од водећих здравствених проблема у свету. Према ревидираним подацима Светске здравствене организације и GLOBOCAN базе података, колоректални карцином заузима неславну трећу позицију, по учесталости код мушког пола и друго место код жена (115). Више од милион и по људи сваке године оболи од карцинома, а преко 1.2 милиона људи годишње умре (115). Инциденца варира у зависности од географског региона (Фигура 3). Централна Африка се сматра регијом са ниском инциденцом (2,3 на 100.000 становника), док се Јапан сматра регијом са високом инциденцом (49,3 на 100.000 становника) (116). Преминација у односу на пол запажена је у свим регијама и процентуално је заступљенија



Фигура 3: Схематски приказ заступљености појединих типова карцинома у свету. (Преузето из <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>)

у мушкараца (117). Разлике у инциденцији постоје и ако се пореде расне и етничке категорије популације. Американци афричког порекла имају већи ризик од настанка колоректалног карцинома и знатно виши морталитет, у односу на белу расу Американаца (118). Према последњим подацима, стандардизована стопа инциденце (на 100000 становника) за карцином колоректума износи 27,0 за целокупну популацију, 33,5 за мушкарце и 21,6 за жене (115) (Фигура 4).

У Србији је забележен пораст инциденце, највише код мушкараца у старосној доби 70–74 године и код жена са 75 и више година, као и у полпулацији млађој од 40 година (119). За развој колоректалног карцинома битно је садејство фактора околине и генетске предиспозиције. Економски напредак друштва мења стил живота, али и навике у исхрани. Прекомерно конзумирање меса, животињских масти, рафинисаних угљених хидрата, исхрана сиромашна влакнима, употреба млечних производа и месних прерађевина, доприносе појави колоректалног карцинома (120).



Фигура 4. Стопа инциденце и морталитета за мушку популацију у 2020. години. А: стопа инциденце карцинома; Б: стопа морталитета. (Преузето из <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>)

Смањена физичка активност, пораст пушења, конзумирања алкохола, урбанизација становништва, стресне ситуације само су неки од фактора који повећавају ризик од карцинома дебелог црева, али и карцинома дојке и плућа (121). Верује се да би измена стила живота и начина исхране могла умањити ризик од оболевања за чак 50% (122). Колоректални карцином обично се јавља око 50 године и касније, са највишом инциденцом у осмој деценији живота (123).

Колоректални карцином се дијагностикује у касним фазама болести јер у већини случајева не даје никакве симптоме (124). Студије су показале да се тумори десне половине колоне карактеришу појавом анемије и обично се случајно откривају, док су тумори леве половине колоне праћени крварењем или променама у пражњењу дебелог црева (125). Појава крви обично је повезана са нижим стадијумом болести, док болови указују на поодмаклу фазу болести (126). Излечење се постиже хируршким третманом у око 80% оболелих, док се код око 40% болесника развија рецидив унутар 5 година од операције (127). У време постављања дијагнозе више од половине болесника је у I и II стадијуму болести, док друга половина има унапредовалу форму, III или IV стадијум. Највећи број случајева колоректалних карцинома настаје спорадично, као резултат генетских варијација заједно са спољашњим факторима ризика, док у мањем броју случајева има наследну генезу (125).

1.2.2 Етиологија колоректалног карцинома

Колоректални карцином обично настаје на терену постојећег аденома колоне или ректума. Студије су показале да је генеза колоректалног карцинома мултифакторијелна, на првом месту због наследних болести попут фамилијарне аденоматозне полипозе колоне, хередитарног неполипозног карцинома колоне и *Peutz-Jeghers*-ове хамартоматозне полипозе (128). Запаљенске болести дебелог црева такође вишеструко повећавају ризик од настанка колоректалног карцинома. Улцерозни колитис повећава ризик од колоректалног карцинома чак 56 пута у односу на општу популацију, унутар 8 година трајања болести (129). Оболели од *Crohn*-ове болести имају мањи ризик у односу на улцерозни колитис, али је тај ризик свакако 20 пута већи у односу на општу популацију (129). Акумулација генетских грешака узрокује дисрегулацију сигналних путева који контролишу миграцију, диференцијацију, апоптозу и пролиферацију. Најзначајнији у том домену је *K-ras* (130). Фактори спољашње средине у садејству са унутрашњим факторима узрокују настанак колоректалног карцинома и то: храна богата мастима и црвеним месом, смањен унос свежег воћа и поврћа, прекомерна конзумација алкохола, неактивност, гојазност, пушење, живот са много стреса. Све заједно ремети биолошки ритам организма и олакшава канцерогенезу (131). Највећи проценат свих тумора дебелог црева чине аденокарциноми, а мање од 10% лимфоми, карциноиди и саркоми (132). Биохемијски показатељи представљају значајан налаз, али је колоноскопија ипак од пресудног значаја (133). Суспектне лезије дебелог црева, па чак и убедљив налаз на ендоскопији, дефинитивно се морају потврдити патохистолошким прегледом материјала. О даљем току лечења, операцији, зрачењу, хемиотерапији одлучује се на основу стадијума болести који се допуњује радиолошким дијагностичким методама (134). Аденом колоне је премалигна лезија, из које се може развити колоректални карцином (135). Уколико се колоректални карцином открије у стадијуму премалигне лезије, шанса за излечење је велика, те се из тог разлога настоји да уведе рутинска скрининг метода раног откривања колоректалног карцинома (136).

1.2.3 Канцерогенеза колоректалног карцинома

Најчешћа обољења дебелог црева су: синдром иритабилног колона, инфламацијске болести црева, колоректални полипи и колоректални карцином (137). Колоректални карцином обично је последица мутација у ћелијама епитела, следствене пролиферације ћелија и стварања проканцерозне лозе ћелија која формира аберантну крипту цревног епитела (138, 139). Услед одржавања континуитета у поремећеној пролиферацији и диференцијацији епителних ћелија, настаје аденоматозни полип. Даље се развијају фазе интермедијарног и касног аденома и на крају трансформација у аденокарцином (140). Стадијум аденокарцинома *in situ* карактерише интактна базална мембрана. След дешавања подразумева диспластичне промене на унутрашњем слоју зида црева, деградацију базалне мембране и метастатски потенцијал (128). Најчешће локализације метастаза колоректалног карцинома су јетра и плућа (141).

Клинички, колоректални карцином у почетним фазама обично нема симптоме, или симптоми нису карактеристични. Колоректални карцином се одликује веома спорим растом. Сматра се да од почетка болести до првих симптома прође између 5 и 10 година. Симптоматологија даље зависи од локализације и степена развоја туморске болести (142).

Постоји више класификација колоректалног карцинома. Према типу ћелија од којих туморске ћелије воде порекло: аденокарциноми, сквамозелуларни карциноми, карциноиди, саркоми и лимфоми. Доминантан тип колоректалног карцинома је аденокарцином, са преко 95% заступљености (143). Према начину настанка постоје, спорадични, наследни и фамилијарни. Најучесталија форма су спорадични колоректални карциноми. Наследни су најређи. На трећем месту по учесталости, налазе се фамилијарни карциноми (144).

Спорадични колоректални карциноми настају услед новонастале мутације, код појединца, без утицаја наслеђа (145). Губитак хетерозиготности за APC (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli*, APC) ген, праћен мутацијама K-ras гена и p53, су најраније појаве у спорадичној колоректалној канцерогенези (146). Мутације и у генима DCC и SMAD заступљене су у око 80-95% случајева спорадичног типа колоректалног карцинома (147). Наследни колоректални карциноми се наслеђују и манифестују у ранијем животном добу (148). Обично постоји наследна полипоза дебелог црева, или хередидарни неполипозни колоректални карцином (енгл. *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* - HNPCC) или *Lynch* синдром- аутозомно доминантна болест која повећава ризик за настанак колоректалног карцинома око 25%. *Lynch* синдром се појављује у два облика, као *Lynch I*, који подразумева колоректални карцином десног колона, укључује појаву мултиплих тумора и често са муцинозном компонентом и *Lynch II* који повећава ризик од карцинома колона, карцинома ендоментријума и мултиплих тумора раније животне доби (149). У основи наследних колоректалних карцинома су мутације у hMLH (енгл. *Human MutL Homolog*, hMLH) генима репарационог система, *hMLH1* и *hMLH2* (150).

У око 20% случајева колоректалног карцинома постоји оптерећујућа анамнеза, односно податак о фамилијарној полипози колона (енгл. *Familial Adenomatous Polyposis*, FAP) (151). Постоје три варијанте фамилијарне аденоматозне полипозе. У класичном облику фамилијарне полипозе колона, у дебелом цреву постоје бројни бенигни полипи чији се број временом повећава. Тако се временом на површини дебелог црева формира „тепих“ аденоматозних полипа, који имају велики афинитет ка малигној алтерацији. Обично настају у касним тридесетим годинама и у основи настанка је мутација APC гена, последичне мутације K-ras онкогена и стварање аденома (152). Губитком функције тумор супресорских гена SMAD4 и p53, аденом се

трансформише у карцином (153). Описани механизам канцерогенезе, развоја карцинома из аденома другачије се означава као аденом-карцином секвенца (154). Каснији развој полипозе, око 55. године, у литератури описан као ослабљена (атенуирана) FAP или *Gardner*-ов синдром, карактерише се присуством полипа на другим местима у организму, појавом остеома и дезмоидних тумора (155). Најблужи тип фамилијарне полипозе, аутозомна рецесивна FAP, карактерише се развојем мањег броја полипа и последица је двоалелне мутације MUTYH гена (156). Синдром хиперпластичне полипозе или синдром тестерастих (вилонских) полипа представља релативно редак синдром који се карактерише мноштвом тестерасто назубљених полипа у колону (157).

1.2.4 Клиничка презентација колоректалног карцинома

Најзначајни показатељ болести је палпабилна маса у дебелом цреву или ректуму. Вредности хемоглобина мање од 100 g/L у оба пола и посебно у групи особа старијих од 60 година, поготову код мушкараца, могу побудити сумњу на постојање малигне болести (158). Ректално крварење је значајан, понекад једини симптом и знак болести. Измењене навике пражњења црева, значајан губитак телесне масе и бол у стомаку, такође, могу бити манифестације колоректалног карцинома (159). Понекад болест постоји али је асимптоматска. Стога су предложене препоруке за дијагностику асимптоматских пацијената и подразумевају тест на присуство оком невидљивог крварења из гастроинтестиналног тракта- FOBТ (енгл. *Fecal occult blood test*, FOBТ) који се клинички показао као веома добар показатељ ризика за развој карцинома завршног дела дебелог црева. Једнократно позитиван FOBТ код асимптоматских, захтева исто поступање као и код клинички манифестних стања (160).

1.2.5 Макроскопске карактеристике колоректалног карцинома

На оперативном материјалу прво се значи део дебелог црева, врста ресеката, затим његова дужина, дебљина и визуализују се проксимална, дистална и радијална ивица ресекције. Затим се посматра површина, сероза, која је у већини случајева неизмењена, сивкасте боје, наглашеног васкуларног цртежа. Након отварања наводе се димензије и локализација тумора, обично за карциноме колона у односу на ивице ресекције, а за ректалне туморе, да ли су изнад, у нивоу или испод перитонеалне рефлексije и удаљеност од зупчасте линије. Тумори макроскопски могу имати полипоидни, односно егзофитични тип, могу бити инфилтративни, улцеришући, инфилтративно-улцеришући, захватати трећину, две трећине или читаву цифкумференцију зида и опструисати лумен. Описује се колико захватају мезоколон, мезоректум (комплетно или инкомплетно) и у каквом су односу са околним структурама (161). Могу да расту у лумен, да инфилтришу зид црева и дубље структуре зида, до у масно ткиво и масно ткиво (161). Проксимални тумори најшешће расту у лумен, као полипоидне масе које се шире дуж једног зида цекума или колона. Карциноми дисталног дела колона чешће имају форму ануларних, стенозантних тумора (162). Слuzница око тумора, може бити очуване грађе или заравњена, лумен испред тумора дилатиран, зид црева истањен (1).

1.2.6 Микроскопске карактеристике колоректалног карцинома

Удаљеност од радијалне ивице ресекције, инвазија крвних судова, лимфних судова, нерава, конфигурација туморског руба (експанзивна- гурајућа или инфилтративна),

имунски одговор (одсутан, благ до умерен и изражен) и дезмопластична реакција (одсутна, блага, умерена и изражена) која даје макроскопску чврстину тумора представљају микроскопске карактеристике колоректалног карцинома. Детектује се и присуство или одсуство некрозе и градира од благе преко умерене до изражене (163). Многи аденокарциноми продукују муцин те се одређује и удео муцинозне компоненте тумора. У највећем броју случајева аденокарциноми са преко 50% муцинозне компоненте имају лошу прогнозу (164). Око 10% аденокарцинома колоне има неуроендокрину диференцијацију. Присуство неуроендокрине компоненте у оквиру аденокарцинома може бити процентуално веома различито (енгл. *Mixed Adenoneuroendocrine Carcinomas* – MANEC) и представља редак патохистолошки ентитет (165).

1.2.7 Патохистолошки типови колоректалног карцинома

Преоперативна хистопатолошка анализа и патохистолошка верификација оперативног материјала, су веома значајне како за прогнозу тако и за планирање и одабир начина лечења. Патохистолошка анализа на оперативном материјалу подразумева дефинисање хистолошког типа и градуса тумора, као и утврђивање патолошког стадијума болести. Анализом регионалних лимфних чворова, дефинише се присуство или одсуство метастатских депозита. Патолог верификује и присуство васкуларне, лимфне или перинеуралне инвазије и особености интратуморског и перитуморског лимфоцитног инфилтрата (166).

По класификацији Светске здравствене организације разликује се неколико хистопатолошких варијанти колоректалног карцинома: аденокарциноми, аденосквамозни, вретенастоћелијски, сератни, микропапиларни и недиферентовани колоректални карциноми (161).

Аденокарциноми завршног дела дебелог црева представљају доминантан хистолошки тип карцинома колоректума и чине преко 95% свих колоректалних карцинома. Воде порекло од епителних ћелија колоректалне слузнице. Класични аденокарциноми су грађени доминантно од жлезданих структура, али се међу њима посебно издвајају: муцинозни аденокарцином, аденокарцином са ћелијама печатног прстена (енгл. *signet ring cell*) и медуларни карцином (161).

Муцинозни аденокарцином (лат. *Adenocarcinoma mucinosum*) је тип колоректалног карцинома са муцинозном компонентом која чини преко 50% волумена тумора (167). Добро и средње диферентовани муцинозни карциноми стварају муцин који се депонује интрацелуларно. У слабо диферентованим облицима колоректалног карцинома, муцин има екстрацелуларну локализацију, интерстицијално, око појединачних туморских ћелија. Муцинозни тип карцинома колоректума често се среће код спорадичних форми колоректалног карцинома, код вилозних аденома и код *Lynch* синдрома (168).

Аденокарциноми колоректума са ћелијама печатног прстена (лат. *Signet ring cell adenocarcinoma*) представљају ретку патохистолошку форму са инциденцом појављивања мањом од 1% свих карцинома колоректума. И овде се као код муцинозног карцинома, *Signet ring cell* карцином дефинише присуством карактеристичних туморских ћелија у волумену од преко 50%. Ћелије печатног прстена у цитоплазми поседују велике, муцином испуњене вакуоле, које дислоцирају једру ћелије уз ћелијску мембрану (169). Обично је спорадичан, веома агресиван тумор, инфилтративног раста и лоше прогнозе. У поређењу са класичним аденокарциномом завршног дела дебелог црева има знатно лошију прогнозу (170).

Медуларни карцином колона (*Carcinoma medulare*) је још једна веома ретка хистопатолошка форма аденокарцинома колоректума са инциденцом појављивања у 5-8/10.000 новодијагностикованих карцинома завршног дела дебелог црева (171). Карактерише се присуством епителоидних туморских ћелија са богатом цитоплазмом, великим везикуларним једрима и проминентним једарцима. Медуларни колоректални карцином је слабодиферентован тумор, али има добру прогнозу (172).

1.2.8 Класификација колоректалног карцинома

Савремена TNM класификација заснива се на патохистолошкој анализи ресецираног сегмента црева и резултатима преоперативне дијагностике. Подразумева систем базиран на основу карактеристика примарног тумора -Т, статуса лимфних чворова-Н и евентуалног присуства метастаза -М (170).

Карактеристике примарног тумора дефинишу дубину инфилтрације зида црева, без обзира на величину тумора. Лимфонодални статус описује захваћеност регионалних лимфних чворова као и број чворова са метастазама. Према препорукама, за квалитетну процену стадијума потребно је анализирати најмање 12 регионалних лимфних чворова (173). Пuteви ширења колоректалног карцинома подразумевају лимфогени, хематогени пут дисеминације и ширење *per continuitatem* на суседне структуре, танко или дебело црево, мокраћну бешику, материцу, или трансцеломично. Обзиром да највећи део венске крви из дебелог црева, дренира портна вена, јасно је да ће метастазе бити најчешће у јетри (174). Образац метастазирања, зависи од хистолошког типа карцинома колоректума. Метастазе колоректума могу се појавити и у плућима, по перитонеуму али се могу појавити и у костима, слезини, мозгу и лимфним чворовима, а веома ретко у панкреасу и срцу (175). Лимфогени пут ширења присутан је код 40-70% колоректалних карцинома, а захваћени ланци лимфних чворова обично прате крвне судове. Код карцинома ректума обично су укључени параректални лимфни чворови, лимфни чворови на бифуркацији доње мезентеричне артерије, хипогастрични и пресакрални лимфни чворови. Хематогени пут ширења најчешће даје метастазе у јетри, плућа и кости. Стадијум тумора се означава од I до IV и одређује на основу TNM класификације (125).

Прецизна преоперативна процена малигне болести је посебно важна јер омогућава планирање и евалуацију оперативног лечења. Разликујемо два типа одређивања стадијума болести: а) клинички – када лекар на основу прегледа, биопсије и спроведених визуелизационих дијагностичких техника даје процену проширености малигне болести и б) патолошки – прецизнији и детаљнији, након спроведеног оперативног лечења (176).

Стадинг колоректалног карцинома прво је клиничко дијагностички, затим хируршки интраоперативно, а затим патолошки после операције. У процени начина лечења највећег значаја има клиничко-дијагностички стадијум туморске болести, док хируршки и патолошки стадијум имају значаја у дефинисању постоперативног третмана (177).

1.2.9 Патолошки стадијум колоректалног карцинома

Постоји више система за класификацију колоректалних карцинома, од којих се најшире примењују TNM класификација, класификација по *Dukes*-у и класификација по *Astler-Coller*-у, које прате степен туморске инвазије и метастатски потенцијал (178).

Сви колоректални карциноми воде порекло од једне малигно алтерисане ћелије, али се начин њиховог раста и макроскопски изглед разликује. Карциноми проксималног дела дебелог црева обично су полипоидног изгледа, са тенденцијом раста у лумен, до потпуне оклузије лумена. Тумори дисталног дела дебелог црева су инфилтративно-улцеришуће лезије и у виду прстена сужавају лумен са захватањем читаве циркумфернције зида, дајући клиничку слику илеуса. И један и други тип су локално инфилтративни (161).

Инвазивни карциноми колоректума инфилтришу зид црева испод ламине мускуларис мукозе. Управо је мишићни слој зида црева критеријум за стадирање тумора према *Dukes*-у. Давне 1932. године *Dukes* је дефинисао систем за процену патолошког стадијума болести и поделио туморе на групу А, В, С и D (170). **Групи А** припадају тумори који захватају слузницу и подслузницу, не захватају мишићни слој зида црева и нису дали метастазе у регионалне лимфне чворове. **Групи В** припадају тумори који у потпуности инфилтришу зид црева, периколично (периректално) масно ткиво, а који нису дали метастазе у регионалне лимфне чворове. **Групи С** припадају тумори који су дали регионалне метастазе, а **групи D** тумори са удаљеним метастазама. Важан прогностички значај, независан од статуса регионалних лимфних чворова представља захваћеност мишића у зиду црева (161).

У циљу прецизнијег дефинисања стадијума тумора *Astler* и *Coller* су 1954. модификовали *Dukes*-ову класификацију (179), тако да се *Dukes*-ова група В дели на В1 и В2 подстадијум. Уколико тумор захвата ламину мускуларис проприје, стадијум тумора је В1, док у В2 стадијуму тумор пробија ламину мускуларис проприје. Стадијум С1 означава туморе који инфилтришу ламину мускуларис проприје, не пробијају је, али су метастазирали у регионалне лимфне чворове. Тумори који пробијају мускуларис проприју и који су дали метастазе у регионалне лимфне чворове, спадају у стадијум С2 (180).

1.2.10 Хистолошки градус колоректалног карцинома

Колоректални карциноми се, на основу хистолошког градуса, могу класификовати на (181):

добро диферентоване туморе - Градус 1 (G1),
умерено диферентоване туморе - Градус 2 (G2),
слабо диферентоване туморе - Градус 3 (G3) и
недиферентоване туморе - Градус 4 (G4).

Добро диферентовани колоректални карциноми су грађени од ћелија чије карактеристике подсећају на ћелије неизмењеног епитела, осим што имају благо нарушен поларитет ћелија. Средње до умерено диферентовани колоректални карциноми су грађени од регуларних и лако ирегуларних тубула. Ћелијски поларитет је сасвим нарушен или изгубљен. Слабо диферентовани колоректални карциноми скоро уопште не подсећају на ткиво од кога воде порекло, док се недиферентовани колоректални карциноми карактеришу потпуним одсуством жлезданих структура (161).

Хистолошку диференцијацију одређује проценат заступљености glandуларних структура у укупној запремини тумора. Добро диферентовани аденокарциноми (HG1) су тумори у којима 95% укупног волумена тумора чине жлездане структуре. Код умерено диферентованих (HG2) процентуална заступљеност жлездане компоненте је између 50% до 95%. Аденокарциноми слабије диференцијације (HG3) поседују мање од 50% жлезданих структура у обично су солидни тумори, чврсте конзистенције.

Одсуство гландуларних структура је главна карактеристика аденокацинома који нису диферентовани (HG4) (182).

Због субјективности сваког патолога, постоји препорука да се за процену хистолошког градуса карцинома колоректума, користи најновија верзија двостепене класификације на *Low grade* и *High grade* туморе. *Low grade* тумори су добро диферентовани колоректални карциноми у чијој грађи жлездана компонента чини преко 50% и *High grade* тумори који су колоректални карциномин мањег степена диференцијације, код којих је присутно мање од 50% гландуларних формација у укупној запремини тумора (161).

Градус хетерогених тумора, се одређује на основу процене најлошије диферентоване компоненте, без обзира на величину примарног тумора. Мана оваквог двостепеног система процене хистопатолошког градуса је примењивост само код класичних аденокарцинома, али не и код осталих хистолошких варијација. Обично се слабодиферентовани тумори сматрају туморима лошије прогнозе (183).

1.2.11 Дијагностика колоректалног карцинома

Клинички, локализација тумора утиче на манифестације туморске болести (184). Тумори десне половине колона су пролиферативне масе, егзофитичног изгледа, који не прати раст строме, па су крвни судови фрагилни. Настаје ситно крварење а на дуже стазе рефрактерна анемија, слабост и малаксалост (185). Туморске масе се тешко или уопште не могу палпирати приликом физикалног прегледа. Тумори леве половине колона сужавају лумен, прати их појава свеже крви у столицама, као и промене у пражњењу, па се чешће детектују од тумора десне половине колона (185). Такође се могу јавити болови у абдомену, који су последица опструкције лумена и прекида пасаже црева, или су последица инфилтрације околних структура. Губитак на тежини, већи од 10% укупне телесне масе, карактеристика је узрапредовале фазе туморске болести. Понекад може настати перфорација колона са развојем перитонитиса, посебно на нивоу цекума (186). Појава крви и локализација тумора у левој половини колона обично иде са нижим стадијума TNM, док анемија, болови, тенезми (лажни позиви на дефекацију) и акутни симптоми као и локализација тумора у десној половини колона, иду са вишим TNM стадијумом. Илеус, перфорација или масивно крварење индикација су за хитну лапаротомију, када се и поставља дијагноза туморске болести. У лабораторијским анализама постоји анемија са дефицитом гвожђа, обично код старијих особа (187). Остали параметри су у физиолошком опсегу, осим када постоје метастатски депозити у јетри, што се карактерише повишеним вредностима билирубина, алкалне фосфатазе, гама-глутамилтрансферазе и трансаминаза (188). Некада су повишене и вредности лактатдеhidрогеназе (189). Ако се као симптом јави дијареја, обично узрокује електролитни дисбаланс и метаболичке поремећаје: хиповолемију, хипокалемију и алкалозу.

Туморски маркери су супстанце које се детектују у крви, телесним течностима и на површини туморских ћелија, у повишеним концентрацијама или први пут и могу указати на присуство тумора (190). Туморски маркери који се користе у дијагностици колоректалног карцинома су: карциоембрионални антиген, карбохидратни антиген и ткивни инхибитор металопротеиназе -1 (191).

Карциоембрионални антиген (енгл. *Carcinoembryonic antigen*, СЕА) је серумски маркер, али како су вредности СЕА дефинисане стадијумом туморске болести, у почетку има снижене вредности, те није погодан за рану детекцију болести. Преоперативно високе вредности СЕА значе и лошију прогнозу (192).

Карбохидратни антиген 19-9 (енгл. *Carbohydrate antigen 19-9*, Ca 19-9) води порекло из ћелија колоректалног карцинома и као и СЕА, сензитиван је за касне фазе колоректалног карцинома (193). Поменути маркери могу бити повећани и у другим болестима, попут: инфламацијских болести црева, неких системских болести, услед појединих навика и клиничких карактеристика тумора (194).

Ткивни инхибитор металопротеиназе-1 је серумски маркер детекције ране фазе колоректалног карцинома. Најбољи резултати постижу се комбиновањем вредности свих поменутих маркера (195).

Након комплетне ресекције туморског ткива, вредности туморских маркера се нормализују ако су биле повећане, односно ишчезавају, уколико су се први пут појавиле. Постоперативно повећање туморских маркера је лош прогностички знак и указује на повећан ризик од појаве рецидива туморске болести (196).

Ендоскопија је неопходна за дијагностику колоректалног карцинома. Колоноскопија је ипак златни стандард за дијагнозу, зато што омогућава визуализацију читавог дебелог црева и узимање узорака за патохистолошку потврду (197). Иригографија се данас све мање користи иако је визуализација сасвим прихватљива (198). Компјутеризована томографија је метода избора у фази узнатредовале туморске болести, првенствено због детекције евентуалних метастатских депозита у јетри и лимфним чворовима. Боља и прецизнија процедура, за детекцију фокалних лезија у јетри и околним органима (специфичнија и сензитивнија) је магнетна резонанца (199). Ендоскопски ултразвучни преглед омогућава да се код болесника са суперфицијалним карциномом (T1N0) уради локална ендоскопска или трансмукозална ресекција без великог реза (200) када је биопсијска процедура уједно и дијагностичка и терапијска. Дефинитивна потврда дијагнозе је анализа биопсијског материјала, преоперативно или постоперативно патохистолошком анализом ресецираног материјала (170). Туморско ткиво чине псеудогландуларне формације спаковане „back to back“ једне уз друге. Интратуморски и перитуморски лимфоцитни одговор, дезмопластична стромна реакција, представљају микроскопске карактеристике карцинома колоректума које говоре у прилог добре прогнозе (183). Карцином колоректума може бити у форми вегетантне промене и растом опструисати лумен или у форми улцерације и захватати дубље слојеве зида црева. Туморско ткиво из мукозе инфилтрише дубље слојеве зида црева, понекад и масно ткиво (183). Имунохистохемијски, ћелије колоректалног карцинома експримирају CK20, CDX2, MUC2 и SATB2 (енгл. *Special AT-rich sequence binding protein 2*, SATB2) од којих је последњи најспецифичнији за туморске ћелије колоректалног карцинома (201). Најновија метода за визуализацију колона је виртуелна или тродимензионална ендолуминална колоноскопија, која омогућава визуализацију интраабдоминалних органа, екстраколичних малигнитета и анеуризматских проширења (202). У столици се PCR методом могу детектовати и генетски маркери, што превасходно има значаја у превенцији и раном откривању карцинома, када још нема симптома туморске болести, јер је генетски материјал карцинома богатији у столици, него у зиду црева, временом се не разлаже нити се разлаже пасажом кроз колон (203). PCR метода омогућава детекцију мутација гена: APC, p53, K-ras и VAT-26 (маркер микросателитне нестабилности), са сензитивношћу од 91% и специфичношћу од 100% (204, 205).

Микросателитна нестабилност (енгл. *Microsatellite instability*, MSI) представља важан универзални биомаркер ризика за појаву колоректалног карцинома, на основу које се колоректални карциноми деле на микросателитно стабилне и нестабилне карциноме. Муцинозни колоректални аденокарциноми у склопу *Lynch* синдрома класификују се као *high-level MSI* тумори и обично су боље прогнозе у односу на муцинозне аденокарциноме, микросателитно стабилне (164). DNA се може детектовати и из крви

оболелих од колоректалног карцинома, али су резултати прелиминарни и мање сензитивни (206).

1.2.12 Ћелијске линије као модел системи испитивања колоректалног карцинома

Ћелијска линија HCT-116 је имортализована адхерентна линија туморских ћелија, изолована из примарног хуманог карцинома дебелог црева. Туморске ћелије су морфолошки веома сличне епителним ћелијама дебелог црева, брзопролиферишуће и врло инвазивне (207). Експримирају кератин, маркер епителних ћелија, TGF- α и TGF- β (енгл. *Transforming Growth Factor, TGF*), те су погодне за испитивање процеса епително-мезенхимске транзиције неопходне за карциногенезу (208). Постоји још неколико ћелијских линија које се користе у истраживањима колоректалног карцинома попут: SW-480 (која је изолована из примарног хуманог аденокарцинома дебелог црева). Спорије пролиферише у односу на HCT-116 туморске ћелије и експримира онкогене *c-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*, *myb*, *sis* и *fos*, а поседује и мутацију у кодону 12 за *ras* протоонкоген, што је чини погодном за генетска тестирања на молекуларном нивоу (209-211).

1.2.13 Мишји модел карцинома колоректума

Модел колоректалног карцинома најчешће се индикује субкутаном применом туморских ћелија линије CT26, ресуспендованих у 50 μ l DMEM-а и апликованих у регију леђа миша. За индукцију карцинома колоректума користи се суспензија са више од 95% живих ћелија. Вијабилност ћелија одређује се непосредно пре инокулације, коришћењем трипан -плавог.

Туморске масе у дебелом цреву могу се палпирати почев од осмог дана након субкутане инокулације туморских ћелија (212).

1.2.14 Лечење колоректалног карцинома

Лечење колоректалног карцинома подразумева хируршко лечење, хемотерапију и адјувантну хемотерапију, према стандардизованим протоколима европске онколошке заједнице (енгл. *European Society for Medical Oncology, ESMO*) (213-215)

1.2.14.1 Хируршко лечење карцинома колоне

Хирург, радиолог, онколог и патолог чине конзилијарни тим који одлучује о лечењу онколошког пацијента (216). По препорукама ESMO у раној фази туморске болести (T1 стадијум болести) се препоручује ендоскопско уклањање тумора, полипектомија, посебно кад постоје придружене болести. Уколико се хистопатолошким налазом докаже чиста линија ресекције, добра диферентованост тумора (G1, G2) и одсуство лимфне инвазије, локална ексцизија довољна је за излечење. Вероватноћа рецидива тумора је већа уколико је тумор лоше диферентован, уколико се налази на ресекционим маргинама или ако постоји инвазија лимфатика. У тим случајевима се повећава и ризик од метастазирања у регионалне лимфне чворове (20% случајева), те се препоручује класична хируршка ресекција (217).

За операбилне форме колоректалног карцинома, неопходна је куративна (R0) колектомија са комплетном мезоколичном ексцизијом, која подразумева уклањање

ресецираног сегмента у блоку, са припадајућим мезоколоном и регионалним лимфним нодусима (215). Лимфу из црева захваћеног тумором дренирају околни лимфатици у пољу од 8 центиметара, стога је препорука да проксимална и дистална ивица ресекције буду удаљене барем по 10 центиметара од самог тумора. За одређивање статуса лимфних чворова тумора неопходно је анализирати најмање 12 лимфних нодуса. Уколико је број уклоњених лимфних чворова мањи од 12, нодални статус се не може дефинисати (173, 215). Лимфни чворови се означавају као негативни, ако немају метастатске депозите или позитивни уколико су исте присутне. Значај уклањања свих лимфних чворова објашњавају следеће чињенице:

- 1) уклањање већег броја лимфних нодуса повезано је са већим процентом преживљавања,
- 2) однос позитивних лимфних нодуса и укупног броја уклоњених лимфних чворова је обрнуто пропорционалан и у корелацији са рецидивирањем болести,
- 3) већи број негативних лимфних је у корелацији са бољом прогнозом чак и у стадијуму узнапредовале болести (218).

1.2.14.2 Хемиотерапија

Врста антитуморске терапије која има за циљ да покрене апоптозу малигно измењених ћелија је хемиотерапија. Протоколи, било системски било регионални, обично подразумевају индукцију сигнала који активирају унутрашњи, митохондријални пут апоптозе (219).

1.2.14.3 Адјувантна хемиотерапија карцинома колоректума

Након оперативног лечења тумора, приступа се адјувантној хемотерапији чији је циљ да смањи ризик од рецидивирања. Адјувантна хемотерапија је усмерена на евентуалне заостале микрометастазе, те се са њеном применом почиње неколико недеља након операције, оптимално од 3. до 8. недеље (220, 221).

Индикација за адјувантну хемотерапију су пацијенти у III стадијуму туморске болести, али и пацијенти у стадијуму II, означени као високоризични. То су пацијенти код којих је: број уклоњених лимфних чворова мањи од 12, тумор слабо диферентован, присутна лимфна, васкуларна или перинеурална инвазија, или је патолошки стадијум тумора- pT4 и када су присутне компликације малигне болести у смислу туморске перфорације и механичке опструкције црева (илеус) (222, 223). Обично се у лечењу у стадијуму II користи комбинација 5-FU (енгл.5- *Fluorouracil*, 5-FU) и леуковорина са оксалиплатином или без ње. У III стадијуму болести комбинују се: флуоропиримидин и оксалиплатина кроз инфузију или пероралну администрацију (224).

Одлагање почетка адјувантне хемиотерапије захтева сагледавање бенефита од увођења терапије, узимајући у обзир штетност поменутих лекова (225). Лапароскопске операције дозвољавају и ранији почетак терапије. Бројне студије су показале да код старијих од 70 година у II и III стадијуму болести нема значајне користи од примене системске терапије са оксалиплатином (226).

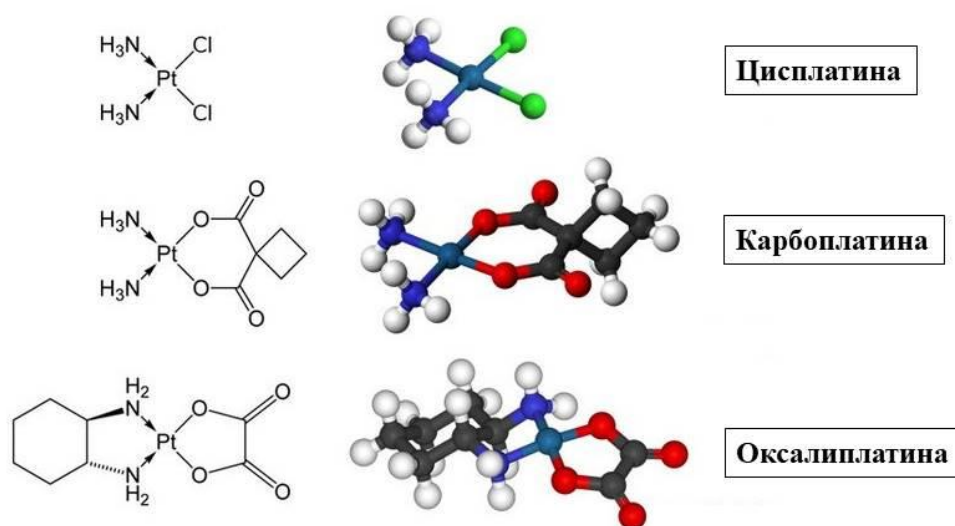
1.3 Терапијски модалитети у лечењу карцинома

Антинеопластици представљају групу лекова који се користе у лечењу малигнух тумора, како примарних тако и метастатских. Обично се хемиотерапијски агенски

комбинују са зрачењем. Код пацијената са локализованим облицима карцинома разликује се неoadјуватна терапија (пре хирушке инцизије тумора), адјуватна (након хирушког захвата) и дефинитивна терапија (код иноперабилиних форми малигнитета, без хирушког одстрањења тумора). Код пацијената са метастазама, хемиотерапија и зрачење се користе са циљем успоравања прогресије болести или у смислу палијације у терминалном стадијуму (101, 103, 227).

1.3.1 Примена комплекса јона метала у антитуморској терапији

Цитотоксички потенцијал цисплатине, $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$, (*cis*-диаминдихлоридоплатина(II)), открио је Розенберг (Rosenberg) 1965. године, проучавајући деобу *Escherichia-e coli* под утицајем сунчеве светлости и амонијум хлорида, кад се сасвим случајно наградио комплекс платине, хемијске формуле ($cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$, који је касније означен као цисплатина (228). Тада заправо почиње испитивање ефеката новосинтетисаног комплекса и ера нових терапијских могућности у лечењу малигнитета. Убрзо затим је показано да цисплатина има цитотоксичко дејство на туморске ћелије у мишићем моделу леукемије и саркома. Само 4 године касније, 1969. цисплатина се први пут употребљава у терапији солидних тумора да би се 1978. уврстила у терапијске протоколе узнапредовалих или метастатских форми карцинома (229). Може се користити самостално као монотерапија или у комбинацији са другим цитостатицима (230). Данас се, у фази истраживања налази 28 различитих комплекса платине, док се у клиничкој пракси користи само неколико- цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина које су приказане на фигури 5 (231, 232).



Фигура 5: Хемијска формула и 3D конфигурација деривата платине који се користе у клиничкој пракси

Карбоплатина је одобрена за употребу од 1989. године, оксалиплатина од 2002. године, док се недаплатина, лобаплатина и хептаплатина користе само у неким земљама азијског континента (у Јапану, Кини и Јужној Кореји) (233). Иако најчешће коришћен антитуморски агенс, цисплатина поред своје ефикасности, има и недостатака који отежавају њену примену. Пре свега то су бројна нежељена дејства и развој резистенције туморских ћелија на дејство цисплатине, слаба хидросолубилност и интравенска примена као једини начин ординирања терапије (231). Да би се добио ефикаснији цитостатик, а притом мање штетан по здраве ћелије организма, стално се синтетишу нова једињења на бази платине.

Све комплексе платине можемо сврстати у три генерације (234):

1. ефикаснији аналози цисплатине ,
2. мање токсични аналози карбоплатине,
3. деривати који имају мање укрштених реакција.

1.3.2 Цисплатина

Цисплатина је представник прве генерације комплекса платине. Структурно се састоји од два хлоридо лиганда, лабилна, одлазећа лиганда и два монодентатна, чврстом везом повезана аминокиселинска лиганда (235). Примењује се у терапији тумора главе и врата, јајника, тестиса, материце, бешике и плућа (236, 237). Ефикасност у лечењу леукемија, тумора бубрега и гастроинтестиналног тракта није задовољавајућа, због развоја резистенције након поновљених доза (229).

Цисплатина делује тако што спречава деобу туморских ћелија. Како? Замена лабилних структурних лиганда цисплатине водом, покреће процес хидролитичке разградње платине и стварање катјонских комплекса платине(II), са једним или два молекула воде. Даље кроз стварање ROS и оксидативни стрес (преко метионина и глутатиона) настаје оштећење молекула DNA, зауставља се транскрипција, односно репликација и покреће процес апоптозе, кроз активацију чувара генома, p53 или преко рецептора смрти (229). Након интравенске апликације, цисплатина брзо продире у ткива и на свом путу до оболеле ћелије интерагује са бројним биомолекулима, посебно са аминокиселинама које садрже сумпор- метионином, цистеином. Молекул за који се цисплатина везује у циркулацији је албумин, али се може везати и за фосфатидил серин или фосфолипиде који улазе у састав ћелијске мембране (238). Занимљива је чињеница да само око 5% примењене дозе цисплатине регује са DNA молекулом из једра, а да се остатак дозе везује за друге протеине или биомолекуле. Наградња јако стабилних једињења цисплатине и сумпорских донора лежи у основи токсичних ефеката цисплатине. Стога се дневне дозе ограничавају на максималних 100 mg/дан до највише пет узастопних дана терапије (239, 240). Цисплатина је неселективна и делује како на ћелије тумора тако и на здраве ћелије и то на дозно зависан начин. Повећавањем дозе расте и степен токсичности лека. Управо је токсичност услед употребе цисплатине у терапији, најзначајнији ограничавајући фактор за клиничку примену (241). Познато је да цисплатина узрокује нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, периферну неуропатију, неутропенију, тромбоцитопенију, ембриотоксичност и генске мутације (242-247).

1.3.3 Токсични ефекти примене цисплатине

1.3.3.1 Нефротоксичност

Цисплатина највише концентрације постиже управо у бубрезима, преко којих се доминантно и елиминише (током пет дана после терапије), што објашњава појаву нефротоксичности код чак петине пацијената. Цисплатина се концентрише у епителним ћелијама, у концентрацији пет пута већој у односу на концентрацију лека у серуму, што додатно појачава токсичност (248, 249). Штетни ефекти на нивоу бубрега подразумевају акутно и хронично оштећење бубрега. Под акутном нефротоксичношћу подразумева се смањење степена васкуларизације бубрега, смањење нивоа калијума, калцијума и магнезијума (250). Хронични ефекти зависе од примењене дозе лека. Ниже терапијске дозе узрокују смањење клиренса креатинина. Смањење гломеруларне филтрације, смањење тубуларне ресорпције у проксималним тубулима и протеинурија настају коришћењем виших доза цисплатине (251). Нефротоксичност је последица оксидационог стреса и последичне продукције кисеоничких радикала (252, 253). Цисплатина такође, инхибира активност ензима антиоксидационе заштите (SOD, GSH-пероксидаза и CAT) (254, 255). Поред значаја реактивних облика кисеоника, за настанак нефротоксичности окривљују се и реактивни азотни радикали RNS (енгл. *Reactive nitrogen species*, RNS), о чему сведоче повећане серумске концентрације пероксинитрита и азот монооксида у студијама на пацовима третираним цисплатином (256, 257). Пероксинитрит узрокује структурна и функционална оштећења протеина, липидну пероксидацију, хемијску модификацију молекула DNA и смањен капацитет ћелијске одбране услед оксидације тио-група ензима (258). Хиперурикемија и хипералбуминемија, такође, поспешују нефротоксичне ефекте цисплатине (259).

1.3.3.2 Хепатотоксичност

Обзиром да се цисплатина излучује и преко жучи, јасно је да ће се токсични ефекти испољити и на јетри. Хепатотоксичност обично настаје при примени високих доза цисплатине (260, 261). У основи хепатотоксичности налази се оксидациони стрес, кроз смањење концентрације глутатион редуктазе и пораст нивоа малониладехида у ткиву јетре (262). Токсичност на нивоу јетре карактерише се порастом нивоа трансаминаза у серуму, понекад уз евидентан пораст и нивоа билирубина (261). На патохистолошким пресецима ткива јетре постоје дегенерација и некроза хепатоцита уз инфилтрацију инфламацијским ћелијама (263).

1.3.3.3 Ототоксичност

Представља ретко нежељено дејство цисплатине и огледа се смањењем или потпуним губитком слуха. Ототоксичност се јавља са инциденцом од 20 до 50% код одраслих особа, док ће манифестације ототоксичности развити свако друго третирано дете (244, 264). Развој ототоксичности је последица оксидационог стреса, посебно поседица повећане активности NADPH (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) -оксидазе присутне у кохлеи (265). Применом високих доза цисплатине код експерименталних животиња, настаје смањење концентрација ензима антиоксидационог система у кохлеарном ткиву и последичан пораст малонилалдехида (265).

1.3.3.4 Кардиотоксичност

Приликом примене цисплатине настаје и оштећење кардиомиоцита. Промене у електрокардиограму, прекордијални болови, инфаркт миокарда, варијације крвног притиска, поремећаји срчаног ритма, кардиомиопатије, запаљење срчаног мишића и срчана слабост (266, 267) су манифестације кардиотоксичности. Употреба цисплатине повећава ризик од тромбозе (268). Цисплатина узрокује оштећење директно као токсин за кардиомиоците и индиректно, кроз појачану продукцију слободних радикала кисеоника и оксидационог стреса (269). Кардиотоксичност се може потврдити значајним порастом нивоа кардијалног тропонина - *cTn* (енгл. *Cardiac troponin*, *cTn*). Пораст нивоа малонилалдехида и лактатдеhidрогеназе у миокарду, као и смањен ниво антиоксиданаса (*GSH*, *SOD*) неминовно узрокује оштећење *DNA* кардиомиоцита (270).

1.3.3.5 Остала токсична дејства

Цисплатина у плућима, у високим дозама, узрокује пнеумонитис, стварање хијалиних мембрана, пуцање алвеоларних септума, депоновање колагена и фиброзу плућа, понекад и коцкасту метаплазију алвеоларног епитела (271). Цисплатина показује и извесну неуротоксичну активност, па се као нежељено дејство могу појавити периферна неуропатија, парестезије, пареза, парализа, испади сензибилитета, моторички поремећаји или конфузија (272). Цисплатина делује токсично и на костну срж, узрокујући супресију активности костне сржи и последичну панцитопенију, повећати склоност ка спонтаним крварењима, инфекцијама и тенденцију за развој анемије (273). Цисплатина током трудноће може узроковати губитак плода или ембриотоксичне последице. Испитивања на анималним моделима показала су репродуктивну токсичност као и трансплаценталну карциногеност. Стога, током терапије и 6 месеци после примене цисплатине, не треба планирати потомство (274). Код једног броја пацијената лечених цисплатином, развила се акутна леукемија (275). Цисплатина је бактеријски мутаген, узрокује хромозомске аберације и генске мутације, а на анималним моделима показује тератогени потенцијал и фетотоксичност (276). На месту примене цисплатине, могу се видети локалне реакције у смислу, црвенила, отока као и системске у смислу развоја шока. Нежељене реакције могу настати током саме апликације лека, или убрзо након примене. Још један значајан ограничавајући моменат за примену цисплатине је то што игле и инфузиони системи, не смеју да садрже алуминијум јер укрштено реагују са цисплатином формирају црни преципитат платине (229, 277). Посебан проблем при примени цисплатине представља предозирање, за које не постоји специфичан антидот, те може узроковати акутно попуштање виталних органа и смртни исход (278). Елиминација цисплатине је двофазног карактера. Полувреме елиминације износи од 10 до 20 минута. Терминално време износи 32 до 53 минута. Елиминација укупне количине платине из једног терапијског циклуса, иде кроз три фазе: прва фаза траје 14 минута, друга фаза 274 минута, док трећа фаза траје читавих 53 дана (279).

У жељи да се пронађе агенс ефикасан као цисплатина, али мање токсичан, синтетисани су бројни аналози цисплатине. Аналози су хемијски модификовани хелацијом са ањонским групама (карбоплатина и оксалиплатина), променама на амину (оксалиплатина), додавањем алифатичних ланаца (мириплатина) или коришћењем транс-конфигурације и позитивног наелектрисања као у случају *VBR3464* и *VBR3571* (280). Поменуте промене у комплексима платине(II) узрокују варијације у величини и просторном распореду конфигурација, самим тим утичу на хидролизу, брзину реактивности и механизме ћелијске имуности. Смањење токсичности цисплатине,

постигнуто је повећањем хидросолубилности и њихове стабилности, заменом одлазећих хлоридо-лиганада хелатним: карбоксилато, гликолато, оксалато, или сулфато лигандима (232). Представник друге генерације аналога цисплатине је карбоплатина.

1.3.4 Карбоплатина

Карбоплатина (1,1'-*cis*-циклобутилдикарбоксилато-диаминоплатина(II)) има један бидентатни одлазећи дикарбоксилато лиганд уместо два монодентатна одлазећа хлоридо лиганда. Показује знатно нижи степен активности, у односу на цисплатину, али се карактерише мањом токсичношћу и не захтева форсирану диурезу, што значајно олакшава примену у терапији и може се примењивати и амбулантно (281). Индикације за примену карбоплатине, исте су као и код цисплатине (282). Током примене карбоплатине најчешће се појављују мучнина, повраћање и супресија костне сржи (283). Другој генерацији деривата платине, припадају још и зениплатина, енлоплатина, CI 973, лобаплатина, SKI 2053, недаплатина и хептаплатина (280). Лобаплатина је 1992. године почела да се кроз клиничке студије употребљава у терапији тумора који су развили резистенцију на цисплатину (карцином плућа, карцином дојке, хронична мијелоидна леукемија, али без значајнијих импликација за клиничку примену (284). Нуспојаве које се могу јавити приликом примене лобаплатине су: осећај мучнине, повраћање, пад тромбоцита, ретко губитак косе, симптоми ототосичности, нефротоксичности и неуротоксичности. Касније је лобаплатина регистрована у Кини за терапију карцинома дојке (284, 285). Недаплатина је од 1998. године. у Јапану регистрована за клиничку употребу за карцином једњака, желуца, јајника, плућа, главе и врата (286). У поређењу са карбаплатином, недаплатина је ефикаснија, растворљивија је и мање штетна за бубреге и костну срж. Хепталплатина је нашла место у лечењу карцинома желуца (287). Осим што је цисплатина неспецифична и токсична, развој ресистенције на десјство цисплатине је веома честа појава и отежава клиничку употребу (231). Резистенција може бити последица дисфункције p53 или повећане експресије Bcl-2 молекула (288).

1.3.5 Оксалиплатина

Трећа генерација аналога имала је за циљ да смањи појаву резистенције туморских ћелија на примењени агенс. Оксалиплатина је најзначајнији представник треће генерације аналога цисплатине (*cis*-оксалато-*trans*-1,2-диаминоциклохексанплатина(II)) (280). Ефикасна је у терапији колоректалног карцинома и леукемијских L1210 ћелијских линија. Представља први аналог који се могао примењивати *per os* (289). Нежељена дејства приликом примене оксалиплатине обухватају: ототоксичност, замор, неутропенију, неуропатије (290, 291).

1.3.6 Нови деривати платине

Новија генерација деривата платине су мононуклеарни и полинуклеарни комплекси, који садрже два или више јона платине који су међусобно повезани мостним лигандима. За добијање алтернативних комплекса платине(II), користи се велики број различитих неорганских и органских лиганада. Један од њих је 1,10-фенантролин (phen), класични планарни хелатни лиганд за јоне прелазних метала и један је од најчешће коришћених лиганда у савременој координационој хемији (280, 292, 293). Фенантролински лиганд је круте структуре, условљене присуством централног

прстена, што резултира тиме да положаји два донорска атома азота буду погодни за координацију и формирање комплекса са платином. Примене комплекса који садрже 1,10-фенантролин су бројне. Познато је да различити деривати нафтиридина смањују вијабилност туморских ћелија. Двострука веза у 1,10-фенантролину у положају 5,6 је најосетљивија на електрофилни напад, тако да могу да настану и деривати епоксида као што је случај у 5,6-дихидро-5,6-епокси-1,10-фенантролину (294). Присуство епоксидног прстена омогућава брзу реакцију са широким спектром нуклеофила и са високом региоселективношћу (295). Мононуклеарни комплекси платине показали су извесну цитотоксичну активност на хуманим леукемијским туморским ћелијама HL-60, али нису испитивани у карциному дојке и колоректалном карциному.

1.3.7 Деривати платине у терапији карцинома дојке

Лечење карцинома дојке изискује примену више хемиотерапеутика који се комбинују. Обично се у комбиновању користе метотрексат, флуороурацил и циклофосфамид (296). Деривати платине су индиковани и код узнапредовалих карцинома дојке, али и код појаве рецидива (297). Бројне клиничке студије су откриле да је цисплатина најефикаснија када се ординира у првој линији хемотерапије, по режиму комбиноване терапије (237). Ипак, бројна нежељена дејства отежавају примену цисплатине, а понекад комбиновање узрокује и изразитију токсичност (цисплатина+етопозид). Стога је оправдана тежња да се пронађе агенс који би имао мању токсичност, који би деловао селективно на туморске ћелије, а притом био ефикасан као и сама цисплатина.

1.3.8 Деривати платине у терапији карцинома колоректума

У адјувантној хемотерапији карцинома колоректума користи се комбинација флуороурацила и оксалиплатине. Делују тако што оштећују молекул DNA, заустављају синтезу како DNA тако и RNA, активирају имунски одговор и покрећу апоптозу туморских ћелија (234). Примена оксалиплатине значајно је повећала преживљавање пацијената са колоректалним карциномом. Примена оксалиплатине је ограничена због развоја резистенције код око 40% случајева. (298). Сензорна неуропатија, кумулативна неуротоксичност и друга нежељена дејства оксалиплатине условила су развој нових терапијских стратегија у лечењу колоректалног карцинома (299).

2 ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

А. Циљ истраживања

Циљ истраживања је испитивање антитуморског дејства мононуклеарних комплекса платине(II), [Pt(L)(5,6-ероху-1,10-phen)] (L - бидентантно кординовани анјон малонске киселине(mal), 2-метилмалонске (Me-mal), 2,2-диметилмалонске (Me₂-mal) и 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (cbdca) и 5,6-ероху-1,10-phen - бидентантно кординовани 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин).

Из основног циља, проистекли су експериментални задаци:

1. Елементална микроанализа састава синтетисаних комплекса платине(II);
2. Инфрацрвена и нуклеарно-магнетно-резонанциона анализа структуре синтетисаних комплекса платине(II);
3. Анализа потенцијалног тумороцидног ефекта синтетисаних комплекса платине(II) *in vitro* на мишијим ћелијским линијама колоректаног карцинома (СТ26), карцинома дојке (4Т1) и мезенхималних матичних ћелија (mMSCs) и хуманим ћелијским линијама карцинома колона (НСТ 116), карцинома плућа (А549) и карцинома дојке (MDA-MB-468);
4. Анализа релативног односа некротске и апоптотске смрти туморских ћелија узроковане испитиваним супстанцама;
5. Анализа молекулских механизма потенцијалне про-апоптотке активности комплекса платине(II);
6. Анализа утицаја комплекса платине(II) на пролиферативни потенцијал *in vitro*, помоћу теста миграције;
7. Анализа утицаја комплекса платине(II) на раст тумора, *in vivo*, одређивањем времена појављивања и величине примарног тумора;
8. Анализа потенцијалних токсичних ефеката (нефротоксичност, хепатотоксичност и кардиотоксичност) комплекса платине(II), *in vivo*.

Б. Радне хипотезе испитивања:

- синтетисати нове мононуклеарне комплексе платине(II), [Pt(L)(5,6-ероху-1,10-phen)]
- извршити карактеризацију комплекса помоћу елементарне микроанализе и различитих спектроскопских метода (¹H и ¹³C NMR, UV-Vis, IR).
- новосинтетисани комплекси платине(II) показују значајни цитотоксички ефекат на малигне ћелије (СТ26, 4Т1, НСТ116, А549, МДА-МВ-468) *in vitro*, и мањи цитотоксични ефекат на мезенхималне матичне ћелије миша (mMSCs).
- новосинтетисани комплекс платине(II) индукује апоптотску смрт малигнућелија.
- новосинтетисани комплекс платине(II) повећава експресију про- а смањује анти-апоптотских протеина.
- новосинтетисани комплекс платине(II) успорава миграцију туморских ћелија.
- новосинтетисани комплекс платине(II) инхибира раст примарног мишијег карцинома дојке.
- новосинтетисани комплекс платине(II) испољава малу токсичност.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Хемикалије и реагенси

Малонска киселина (H_2mal), 2-метилмалонска киселина ($Me-H_2mal$), 2,2-диметилмалонска киселина (Me_2-H_2mal), 1,1-циклобутандикарбоксилна киселина (H_2cbdca), 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин (5,6-epoxy-1,10-phen), деутерисани диметил сулфоксид (енгл. *Dimethyl sulfoxide*, DMSO - d_6), калијум-тетрахлоридоплатинат(II) ($K_2[PtCl_4]$), физиолошки раствор са фосфатним пуфером (енгл. *Phosphate buffered saline*, PBS), 3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијумбромид (енгл. *Ethidium bromide*, EtBr), DNA, CT-DNA, говеђи серум албумин (енгл. *Bovine serum albumin*, BSA) купљени су од *Aldrich Chemical Co (Merck)*. Сребрне соли дикарбоксилних киселина, опште формуле Ag_2L (где је L анјон малонске, метилмалонске, диметилмалонске и циклобутандикарбоксилне киселине) добијене су у реакцији натријумове соли дикарбоксилних киселина (H_2mal , $Me-H_2mal$, Me_2-H_2mal и H_2cbdca) и еквимоларе количине сребро-нитрата, на собној температури, у мраку преко ноћи (300). Добијени бели талог, Ag_2L , је одвојен филтрацијом и чуван у мраку. Комплекс $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ је синтетисан према раније објављеној процедури [14]. Основни раствор CT-DNA је припремљен у 0,01 М раствору PBS-а, чији је рН=7,4, који даје UV апсорбанцу на 260 nm и 280 nm (A_{260}/A_{280}) од око 1,8–1,9, што указује на чистоћу раствора CT-DNA, који је без контаминације протеинима. Концентрација раствора CT-DNA одређена је на основу UV апсорбанце на 260 nm ($\epsilon=6600 M^{-1}\cdot cm^{-1}$) (301). Основни раствор BSA је припремљен у 0,01 М раствору PBS-а при рН=7,4 концентрације 2 μM . Све остале комерцијално доступне хемикалије, су биле највеће чистоће и коришћене су без даљег пречишћавања.

3.2 Синтеза мононуклеарних комплекса платине(II), Pt1-Pt4

Комплекси Pt(II), типа $[Pt(L)(5,6-epoxy-1,10-phen)]\cdot nH_2O$ ($n = 1,2$) (где је L бидентатно координовани анјон малонске киселине (mal, **Pt1**), 2-метилмалонске (Me-mal, **Pt2**), 2,2-диметилмалонске (Me_2-mal , **Pt3**) и 1,1-циклобутандикарбоксилне (cbdca, **Pt4**) киселине, 5,6-epoxy-1,10-phen је бидентатно координовани 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин, синтетизовани су по модификованом поступку раније објављеном у литератури (302). Раствор добијен мешањем 105,6 mg (0,25 mmol) $cis-[PtCl_2(dmsO)_2]$ и еквимоларне количине соли сребра дикарбоксилне киселине (L) у 15 mL воде, остављен је током ноћи, на мешалици, на собној температури, у мраку. Након елиминације преципитата (AgCl) методом филтрације, добијени бледожути раствор $[Pt(L)(dmsO)_2]$ је коришћен као полазни материјал за припрему мононуклеарних комплекса Pt(II), $[Pt(L)(5,6-epoxy-1,10-phen)]\cdot nH_2O$. У раствор $[Pt(L)(dmsO)_2]$ додата је еквимоларна количина (49,1 mg, 0,25 mmol) 5,6-epoxy-1,10-phen лиганда. Реакциона смеша је мешана и загревана на 40°C током 3 сата. Сви комплекси су кристализовани из воде, хлађењем у фрижидеру. Чисти комплекси су добијени рекристализацијом из мале количине воде. Чистоћа комплекса Pt1-Pt4, проверена је елементалном микроанализом, NMR (1H and ^{13}C), IR спектроскопијом и UV-vis спектрофотометријом. Кристали анхидрованог $[Pt(Me_2-mal)(5,6-epoxy-1,10-phen)]$ (Pt3) су добијени рекристализацијом из мале количине хлороформа.

3.3 Карактеризација мононуклеарних комплекса платине(II)

Чистоћа и састав новосинтетисаних комплекса Pt(II), проверени су помоћу резултата елементалне микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR и инфрацрвене спектроскопије, UV-Vis спектрофотометрије и рендгенске структурне анализе. За снимање ^1H и ^{13}C NMR спектра $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ комплекса као растварач коришћен је DMSO- d_6 .

3.3.1 Мерење рН вредности

Сва мерења рН вредности су одређивана на 25 °C. За ову сврху коришћен је рН-метар *Iskra* MA 5704, који је калибрисан у односу на *Fischer*-ове пуферске растворе за рН = 4,0 и рН = 7,0. Измерене рН вредности нису кориговане у односу на деутеријумски ефекат.

3.3.2 Елементална микроанализа

Елементална микроанализа за C, H и N параметре је извршена на Микроаналитичком одељењу Института за хемију Хемијског факултета, Универзитета у Београду, а анализа је спроведена на апарату *Vario III* C, H, N, S *Elemental Analyzer* у *CHS* моду.

3.3.3 Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија NMR (^1H и ^{13}C) мерења

Нуклеарно-магнетно-резонанциони спектри (^1H и ^{13}C NMR) комплекса су снимани на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу коришћењем спектрофотометра *Varian Gemini-2000* NMR. Спектри ^1H и ^{13}C NMR су снимани употребом растварача D_2O и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (DMSO- d_6) и референтног стандарда TSP (натријум-3-(триметилсилил)-пропионат-2,2,3,3- d_4).

3.3.4 UV-Vis спектрофотометрија

Електронски апсорпциони спектри су снимани на Природно-Математичком факултету, у Институту за хемију, Универзитета у Крагујевцу, на *Shimadzu* UV-Vis спектрофотометру при концентрацији испитиваних Pt(II) комплекса од $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$. Спектри су снимани у опсегу таласних дужина 200-500 nm на 25 °C. Добијени резултати су обрађени применом компјутерског програма *Microsoft Office Excel*.

3.3.5 Инфрацрвена спектроскопија

Инфра-црвени (енгл. *Infrared*, IR) спектри су снимани на Природно-Математичком факултету, у Институту за хемију, на *Perkin-Elmer Spectrum One* FT-IR спектрометру применом KBr технике у опсегу таласних дужина 450- 4000 cm^{-1} .

3.3.6 Рендгенска структурна анализа анхидрованог Pt3 комплекса

Рендгенска структурна анализа монокристала добијених за комплекс [Pt(Me₂-mal)(5,6-ероху-1,10-phen)] рађена је на -123 °C (150 K), на „SuperNova” дифрактометру са „Atlas” детектором коришћењем софтвера „CrysAlis”, применом МоК α радијације ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Структура једињења је решена директном методом коришћењем програма „SHELXT” и графичког корисничког интерфејса „Olex2” (303). Утачњавање F^2 магнитуде на основу анизотропних термалних параметара за све атоме теже од водоника урађено је коришћењем Olex2 или SHELXL_2018/3 програма (303). Атоми водоника постављени су на израчунате позиције. Сlike су припремљене помоћу програма „Mercury” (304).

3.3.7 Испитивање стабилности комплекса Pt1-Pt4 UV-Vis спектрофотометријом

Стабилност $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ мононуклеарних комплекса Pt(II) у $0,01 \text{ M}$ раствору PBS-а испитивана је праћењем промена у њиховим апсорпционим спектрима током 48 сати на собној температури. UV-Vis спектри у опсегу од 240 до 400 nm снимљени су на Shimadzu спектрофотометру који је опремљен хелијом за термостатирање, коришћењем кварцне ћелије од $1,00 \text{ cm}$.

3.4 Испитивање интеракције синтетисаних комплекса платине(II) са DNA

3.4.1 UV-Vis спектрофотометријска мерења

Интеракције Pt1-Pt4 комплекса са CT-DNA су испитивана помоћу UV-Vis спектрофотометрије. Експерименти су спроведени при константној концентрацији одговарајућег комплекса, Pt1-Pt4, ($10 \text{ }\mu\text{M}$) и варирањем концентрације раствора CT-DNA од $3,0\text{-}16 \text{ }\mu\text{M}$ ($r = [\text{CT-DNA}]/[\text{комплекс}] = 0\text{-}1,6$). Вредности апсорпције су бележене на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ након сваког узастопног додавања раствора CT-DNA, током 24 сата. За мерење апсорпције коришћен је $0,01\text{M}$ раствор пуфера PBS, при $\text{pH} = 7,4$ и на температури од 37°C . Вредност унутрашње константе везивања (K_b) одређена је коришћењем једначине (305): $[\text{DNA}](\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$, где је DNA] концентрација CT-DNA, ϵ_a и ϵ_b екстинкциони коефицијенти слободног комплекса и комплекса када је за њега везан CT-DNA молекул, а ϵ_f је екстинкциони коефицијент одређен из калибрационе криве која је добијена одређивањем апсорпције слободног комплекса при различитим концентрацијама. Зависност $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ у односу на $[\text{DNA}]$ даје праву линију чији нагиб даје вредност $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$, а одсечак на у оси вредност $1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$. Унутрашња константа везивања (K_b) је израчуната из односа нагиба праве и одсечка на у оси. Слободна Gibbs-ова енергија (ΔG) Pt(II)/ CT-DNA комплекса израчуната је на основу једначине: $\Delta G = RT \ln K_b$; где је R идеална гасна константа, T температура, а K_b вредност унутрашње константе везивања.

3.4.2 Флуоресцентна мерења

Интеракције комплекса Pt1-Pt4 са CT-DNA у присуству EtBr, испитиване су применом емисионе флуоресцентне спектроскопије, мерењем промене интензитета флуоресценције раствора EtBr/ CT-DNA након додавања испитиваних комплекса Pt(II). Раствор комплекса EtBr/ CT-DNA је првобитно припремљен мешањем раствора EtBr и CT-DNA у молском односу 1:1 у $0,01 \text{ M}$ раствору PBS-а при $\text{pH} = 7,40$, на температури

од 25 °C. Затим је у тако припремљен раствор EtBr/ СТ-DNA комплекса додаван раствор Pt1-Pt4 комплекса уз постепено повећање концентрације, 1,89-17,00 μM, и мерена је промена интензитета флуоресценције. Емисиони спектри су снимани у опсегу 550-700 nm са ексцитацијом на 527 nm. Пре мерења, сваки раствор је промешан и инкубиран на собној температури 5 минута. Комплекси Pt(II) нису показали флуоресценцију у наведеним условима. Добијени подаци о гашењу флуоресценције су анализирани према *Stern–Volmer*-овој једначини (306): $I_0/I = 1 + K_{sv}[Pt(II) \text{ комплекс}] = 1 + k_q \tau_0 [Pt(II) \text{ комплекс}]$, где су I_0 и I интензитети флуоресценције у одсуству и присуству комплекса Pt(II), K_{sv} је *Stern–Volmer*-ова константа гашења, k_q – константа брзине гашења, τ_0 - просечни животни век биомолекула без присуства комплекса и $[Pt(II) \text{ комплекс}]$ - укупна концентрација раствора Pt1-Pt4 комплекса. Добијени резултати графички су приказани као завистност I_0/I од $[Pt(II) \text{ комплекс}]$. Вредност K_{sv} се израчунава из нагиба добијене праве. Механизам гашења (динамички или статички) разјашњава се одређивањем k_q . Статички механизам се јавља када су вредности k_q веће од граничне константе дифузије биомакромолекула ($2,0 \cdot 10^{10}$ L/mol·s) и обрнуто. На основу *Hil*-ове једначине: $\log[(I_0-I)/I] = \log K_a + n \cdot \log [Pt(II) \text{ комплекс}]$ добијене су вредности константе везивања K_a и број места везивања (n). Резултати су приказани графички као завистност $\log(I_0-I)/I$ од $\log [Pt(II) \text{ комплекс}]$. Константа везивања K_a добијена је из пресека праве са у-осом, а из нагиба праве добијен је број везујућих места (n) (307).

3.5 Мерење вискозитета

Вискозитет је мерен коришћењем вискозиметра који је одржаван на $25 \pm 0,1$ °C, помоћу воденог купатила са термостатом. Релативни вискозитет раствора СТ-DNA $\eta_r = \eta/\eta_0$ (η је вискозитет DNA у присуству Pt(II) комплекса, η_0 је вискозитет DNA само у пуферу) мерен је при константној концентрацији СТ-DNA и са различитим концентрацијама Pt1-Pt4 комплекса. Време протока је мерено дигиталном штоперицом, а сваки узорак је мерен шест пута након чега је израчунато просечно време протока. Вредности вискозитета су израчунате из уоченог времена протока раствора који садрже СТ-DNA (t) коригованог за време протока самог пуфера (t_0), $\eta = (t - t_0)/t_0$. Подаци су представљени као однос $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ и $[Pt(II) \text{ комплекс}]/[СТ-DNA]$.

3.6 Испитивање интеракције синтетисаних комплекса платине(II) са BSA

Интеракције синтетисаних моноклеарних комплекса Pt(II) са говеђим серум албумином испитиване су применом емисионе флуоресцентне спектроскопије. Везивање испитиваних комплекса Pt(II), Pt1-Pt4, за албумин праћено је на основу смањења интензитета флуоресценције триптофана у раствору BSA, на 352 nm, након додавања раствора комплекса Pt(II). Сви експерименти изведени су на собној температури у 0,01 M PBS пуферском раствору (pH=7,40) да би се одржали физиолошки услови. Концентрација BSA је одржавана непромењеном и износила је 2 μM, док је концентрација испитиваних Pt(II) комплекса постепено повећавана до 40 μM. Емисиони спектри су снимљени у опсегу 300–500 nm са ексцитацијом на 295 nm. На основу једначине $I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$, где је I_0 почетни интензитет флуоресценције триптофана у говеђем серум албумину, I је интензитет флуоресценције триптофана у BSA након додавања Pt(II) комплекса у раствор, k_q је константа гашења флуоресценције, τ_0 је просечно време флуоресценције албумина у одсуству комплекса и $[Q]$ је концентрација Pt(II) комплекса, израчуната је вредност *Stern–Volmer*-ове константе K_{sv} . Константа везивања комплекса за BSA (K_a) и број места везивања (n)

израчунати су помоћу *Scatchard*-ове једначине: $\log(I_0 - I)/I = \log K_a + n \cdot \log[Q]$, при чему су резултати представени графички као зависност $\log(I_0 - I)/I$ од $\log[Q]$. Вредност константе везивања K_a добија се из пресека праве са у-осом, а број везујућих места (n) из нагиба праве.

3.7 Методологија *in vitro* есперимената

3.7.1 Линије малигних ћелија

- Ћелијска линија мишјег карцинома дојке 4T1 (*American Type Culture Collection CRL-2539, ATCC, USA*),
- Ћелијска линија мишјег карцинома колоректума CT26 (*American Type Culture Collection CRL-2638, TCC, USA*),
- Ћелијска линија хуманог карцинома колоректума HCT 116 (*American Type Culture Collection ATCC® CCL-247™, USA*),
- Ћелијска линија хуманог карцинома плућа A549 (*American Type Culture Collection ATCC® CCL-185™, USA*),
- Ћелијска линија хуманог карцинома дојке MDA-MB-468 (*American Type Culture Collection ATCC® HTB-132™, USA*).

Линија 4T1 је добијена из тумора дојке који се спонтано развио код миша соја BALB/c (699). Модел одговара узапредовалом карциному дојке код жена те се зато најчешће и користи у истраживањима карцинома дојке. Индукција туморске болести може бити локална када ћелије апликујемо у млечну жлезду (ортотопски модел) или по хетеротопском моделу, апликацијом туморских ћелија: у дорзалну регију, интравенски у репну вену, катетеризацијом десне каротидне артерије или интракардијално у леву преткомору. Након апликације туморских ћелија, формира се примарни тумор, а обично 3 до 6 недеља након индукције болести, настају и хематогене метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу.

Поред 4T1 ћелијске линије, у овој студији су коришћене ћелије мишјег карцинома колона CT26, хуманог карцинома колона HCT116, хуманог карцинома дојке MDA-MB-468 и хуманог карцинома плућа A549. Ћелијска линија мишјег карцинома колона CT26, изолована је из карцинома колоректума у BALB/C миша индукованог N-нитрозо-N-метилуретаном. Овај анимални модел је најпогоднији за тестирање терапијских модалијета и уопште за проучавање колоректалног карцинома.

Линије туморских ћелија су чуване у крио-протективном медијуму. То је комплетан медијум за раст ћелија, DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*, DMEM), у чијем се саставу налази: 4,5g/l глукозе, 10% FBS, 2mmol/l L-глутамин, 1mmol/l натријум пирувата, 10mmol/l HEPES-a, 100U/mL пеницилина, 100µg/mL стрептомицина и 1mmol/l неесенцијалних аминокиселина (*Sigma, USA*) са додатком 5% DMSO. Све до тренутка планираних експеримената биле су залеђене у контејнерима са течним азотом, а затим су непосредно пре експеримента биле одлеђене у воденом купатилу (37°C, током два минута) и засејане на одговарајућу подлогу – фласк (*BD Falcon*). Крио-протективни медијум је уклоњен додавањем комплетног медијума у волумену од 9 ml, а затим десетоминутним центрифугирањем на 350G. Након одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума, пребачене у фласк за култивацију и инкубиране у атмосфери 5% CO₂, засићеној воденом паром на температури од 37°C. Пре употребе, комплетан медијум је инкубиран на собној температури, најмање 15 минута, како би се стабилизовала pH

вредност. Ћелије су култивисане у строго асерптичним условима, унатар ламинара, у фласковима одговарајућег волумена. У просеку, за 24 сата, ћелијска популација се удвостручи. За култивацију наведених линија малигних ћелија миша коришћен је DMEM са додатим FBS, *L-glutamine*, *penicillin/streptomycin* и неесенцијалним аминокиселинама. Малигне ћелије су култивисане на 37°C, у инкубатору у присуству 5% CO₂. Пре започињања експеримента, ћелије из фласкова, конфлуентности око 80%, одвајане су са дна флашка краткотрајним излагањем раствору трипсина концентрације 0,25% у трајању од 1 минута. Ћелије су затим пране комплетним медијумом са додатком FBS-а, у концентрацији од 10%, са циљем инактивације трипсина и спречавања ћелијског оштећења. Одвојене ћелије скупљане су у епрувете, а затим у трајању од 10 минута, центрифугиране на 125G.

Ћелије су затим бојене трипан плавим (енгл. *trypan-blue*), како би се одредила њихова вијабилност. Трипан плаво је боја која улази у ћелију преко нарушене ћелијске мембране. Виталне ћелије поседују интактну ћелијску мембрану и остају необојене. У свим експериментима користиле су се само ћелијске суспензије које су садржале преко 95% виталних, живих ћелија.

3.7.2 МТТ тест за испитивање цитотоксичког деловања

Вијабилност малигних ћелија третираних новосинтетисаним комплексима платине, цисплатином, карбоплатином и 5,6-ероху-1,10-phen лигандом, је испитивана МТТ тестом (308). МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*), је хидрофобан жути кристал, позитивно наелектрисан. У метаболички активним, живим ћелијама, МТТ из жуте прелази у љубичасте кристале (МТТ се редукује до формазана). Ензим митохондријална сукцинат дехидрогеназа је активна само у вијабилним ћелијама, тако да је реакција редукције у директној пропорцији са бројем активних вијабилних ћелија. Обзиром да се љубичасти фристали формазана растварају у DMSO-у, могуће је помоћу спектрофотометрије квантификовати интензитет љубичасте боје, на 595 nm таласне дужине. У нашем истраживању испитивали смо ефекат новосинтетисаних супстанци поређењем интензитета боје ћелија које се налазе у медијуму и интензитета боје ћелија третираних испитиваним комплексима.

Малигне ћелије у истраживању, излагане су новосинтетисаним комплексима платине, цисплатини, карбоплатини и 5,6-ероху-1,10-phen лиганду, током 48 сати у различитим концентрацијама (3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 and 500 μM). По истеку 48 сати, у свако бунарче је сипано по 100 μl медијума са 20 % МТТ раствора (5mg/1ml у PBS-у). Инкубација плоча трајала је наредна 4 сата. Оптичка густина одређивана је на таласној дужини од 595 nm, употребом *Microplate multimode detector Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments, Austria*. Цисплатина коју смо користили у експериментима произвођача је *Sigma-Aldrich, Munich, Germany*.

Малигне ћелије су прикупљене из фласкова у експоненцијалној фази раста. Број ћелија је одређиван коришћењем *Neubauer*-ове коморе. Након бројања ћелија, припремљена је суспензија ћелија, густине 3×10^4 ћелија/ml. 100 μl ћелијске суспензије, сипано је у микротитар плоче са 96 бунара тако да буде 3000 ћелија по бунару. Ћелије су затим инкубиране 24 часа у стандардним условима. Након тога је одливен медијум, а додати комплексима платине, цисплатине, карбоплатине и 5,6-ероху-1,10-phen лиганд у концентрацијском опсегу од 3,91 μM до 500 μM у укупном волумену сваког бунара од 100 μl . Ћелије су затим инкубиране наредних 48 сати. По истеку 48 сати, течност из свих бунара је одливена, а затим је у сваки бунар сипано по 100 μl медијума са 20 % МТТ раствора (5mg/ml у PBS-у). Уследила је четворочасовна инкубација у

стандардним условима. Након инкубације одливен је медијум и у сваки отвор је доато по 150µl DMSO-а (*Sigma Aldrich, Germany*) и 20 µl глицинског пуфера (pH-10,5). Оптичка густина (OD) израчуната је коришћењем *Microplate multimode detector Zenyth 3100* на таласној дужини од 595 nm.

За одређивање вијабилности ћелија користили смо формулу (309):

$$(E-B)/(K-B) \times 100 = \% \text{ вијабилних ћелија}$$

E- апсорбанца ћелија третираних испитиваним комплексом,

B- апсорбанца контроле,

K- апсорбанца нетретираних ћелија.

Вредности апсорбанце ћелија третираних испитиваним комплексима су упоређиване са вредностима апсорбанци нетретираних ћелија. На основу тога је израчунато повећање или смањење вијабилности ћелија услед деловања новосинтетисаних комплекса платине. Подаци коришћени за анализу су добијени из три независна експеримента.

Индекс селективности је израчунат по формули : IC_{50mMSC}/IC_{50} туморских ћелија.

3.7.3 Анализа апоптотске смрти

Цитотоксички потенцијал новосинтетисаног комплекса анализиран је проточном цитометријом, на ћелијама третираним Annexin-ом V и пропидијум-јодид-ом (енгл. *Propidium iodide, PI*). Ћелијска мембране је очувана у раној фази апоптозе, али се губи асиметрија мембранских фосфолипида, те се фосфатидил-серин експримира са спољашње стране ћелијске мембране. Annexin V је протеин који се везује за калцијум, фосфолипиде и фосфатидил-серин. У касним фазама апоптозе и у ћелијама у некрози, нарушава се континуитет ћелијске мембране, па се поједини молекули попут PI, везују за DNA ћелије. Необојене ћелије: Annexin V (-); PI (-) се означавају као живе; Annexin V (+); PI (-) су ћелије у раној фази апоптозе; Annexin V (+); PI (+) ћелије у касној фази апоптозе, а Annexin V (-); PI (+) ћелије су ћелије у некрози.

По постизању конфлуентности ћелијских популација од око 70%, замењен је медијум, медијумом са додатком испитиваног комплекса Pt(II), односно са додатком цисплатине у концентрацији која је одговарала вредностима IC_{50} . IC_{50} вредности су добијене из серије предексперимента коришћењем МТТ теста. Контролне ћелије нису фармаколошки третиране. После двадесетчетворочасовне инкубације, опране су ћелије и разблажене у пуферу. Потом је додато Annexin-a V-FITC (*BD Pharmingen, San Diego, California, USA*) и PI (*Sigma Aldrich, Germany*) у волумену од по 5µl (50µg PI /ml PBS-a). Након инкубације на собној температури, у мраку у трајању од 15 минута, у сваки узорак је наливено по 400µl пуфера 1X. На проточном цитометру (*FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, USA*), анализирано је 20000 догађаја, а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (*Tree Star*).

3.7.4 Анализа потенцијалног про-апоптотског ефекта испитиваног комплекса

Проточном цитометријом испитивана је и експресија антиапоптотских протеина коришћењем антимишјих моноклонских антитела Bcl-2 (*Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA*) и BclXL (*Thermo Fisher Scientific*), као и проценат ћелија које садрже активну каспазу-3 (*Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA*). Туморске

ћелије линија 4T1, CT26 и HCT 116 су инкубирани 24 сата у медијуму са додатком новосинтетисаног Pt3 комплекса, односно цисплатине у концентрацији која одговара вредностима IC₅₀ или у чистом комплетном медијуму (контролне ћелије). Ћелије су анализирани коришћењем проточног цитометра (*FACS Calibur flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, USA*), а добијени подаци анализирани коришћењем *FlowJo* софтвера (*Tree Star*).

Коришћењем антитета за негативну изотипску контролу, стандардизовали смо интензитет флуоресценције. Просечан интензитет флуоресценције ћелија од интереса (енгл. *Meanfluorescence intensity, MFI*) конкретно за молекуле Вах и Bcl-2, смо израчунали као однос интензитета флуоресценције одговарајућег протеина (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле. Анализом процента ћелија које су емитовале флуоресценцију израчунали смо експресију активне каспазе-3 у третираним и нетретираним туморским ћелијама.

3.7.5 Анализа експресије Ki-67

Проточном цитометријом мерена је и експресија маркера пролиферације, Ki-67 у туморским ћелијама линија 4T1, CT26 и HCT116, које су третиране инхибиторним IC₅₀ концентрацијама новосинтетисаног комплекса платине, Pt3 или цисплатине, током 24 часа.

Након инкубирања које је трајало 24 часа, малигне ћелијске линије: 4T1, CT26 и HCT116 су опране у хладном раствору PBS-а и разблажене у комплетном медијуму. Ћелијске суспензије имале су густину од 3x10⁶/ml. Малигне ћелије су затим биле изложене фиксативу и пермеабилзацији (*Fixation and Permeabilization Kit, BD Bioscience*), током 20 минута на 4°C. Након инкубације, ћелије су опране у *Perm/Wash™ Buffer*-ом и центрифугиране на 125G, 10 минута. Издвојени супернатант смо одлили, а малигне ћелијске линије 4T1, CT26 и HCT116 инкубирани примарним антителима која су претходно обележена флуорохромом (*FITC*). Након тога ћелије су опране у *Perm/Wash™ Buffer*-у, центрифугиране и ресуспендоване у 250µl пуфера за бојење.

3.7.6 Тест миграције

Тест миграције или "*Scratch*" тест је коришћен за *in vitro* испитивање способности миграције туморских ћелија (310). Тест миграције у лабораторијским условима опонаша миграцију туморских ћелија у живом систему. У по три микротитар плоче са 6 бунара по ћелијској линији, засејане су ћелијске линије 4T1, CT26, HCT116 и гајене док нису формирале конфлуентан монослој. Нежним покретом, под углом од 30 степени, стерилним наставком за микропипету од 1000 микролитара, у сваком бунару је начињен линеарни дефект. Ћелије су затим опране PBS-ом, након чега је у одговарајуће бинаре сипан чист медијум, затим медијум са испитиваним комплексом платине и медијум са цисплатином. Ћелије су третиране новосинтетисаним комплексом у концентрацији 10, 15 и 20 µmol/l. Уследила је инкубација у стандардним лабораторијским условима. Промене у ћелијској миграцији снимане су у више временских пресека, и то у 0, 4, 20. и 24. часу након замене медијума, коришћењем инвертног микроскопа на увећању 10x. За анализирање слика користили смо софтвер *Image J*.

3.8 Методологија у *in vivo* есперимената

3.8.1 Испитивање токсичности новосинтетисаног Pt3 комплекса *in vivo*

Да би се испитало да ли постоји корелација између резултата добијених на културама ћелија и ефеката у живом систему, спроведена су *in vivo* испитивања на мишјем моделу карцинома дојке.

3.8.2 Експерименталне животиње

Истраживање је спроведено на мишевима женског пола, соја BALB/c, старости од 8 до 12 недеља. Животиње су гајене према прописаним узгојним условима (храна и вода за пиће *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла, температуре и ваздуха) све до завршетка експеримента у виваријуму Центра за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Целокупан рад са животињама у овој студији обављен је уз одобрење Етичке Комисије Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (број одлуке: 01-291 од 15.01.2020.).

За реализацију експеримената мишеви су методом случајног избора подељени у 3 групе животиња (n=20) којима је индукован тумор дојке (Фигура 6):

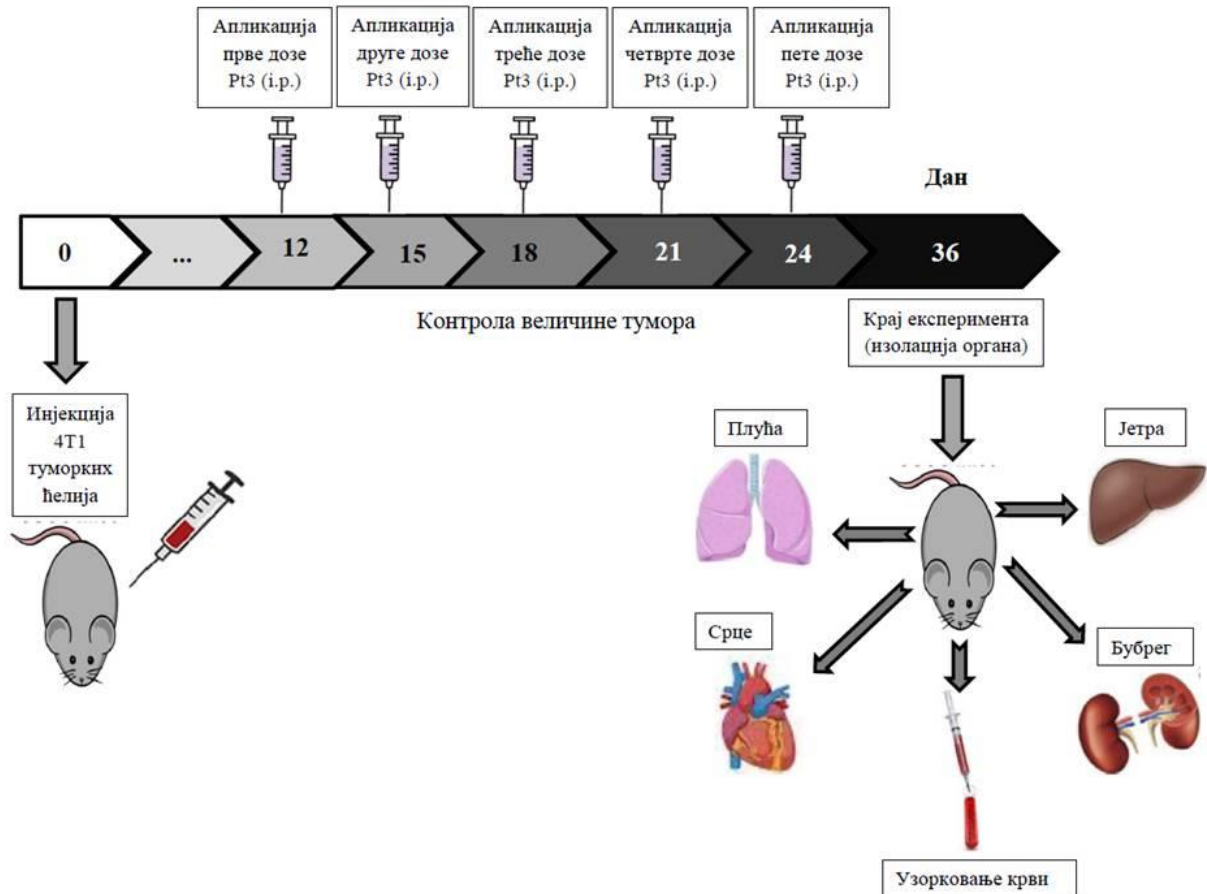
I - експериментална група која је третирана новосинтетисаним комплексом Pt(II)- Pt3

II - група која је третирана цисплатином

III - контролна група, фармаколошки нетретирана

3.8.3 Експериментални модел карцинома дојке

Карцином дојке индукован је апликацијом линије малигнух ћелија 4T1, сингене за BALB/C мишеве. Малигне ћелије убризгане су субкутано, директно у 4. млечну жлезду десно, у дози од 5×10^3 4T1 ћелија ресуспендовано у 50 μ l DMEM-а. Новосинтетисани комплекс Pt(II)- Pt3 се примењивао интраперитонеално, у дози од 10mg/kg, ресуспендован у 200 μ l физиолошког раствора, у режиму од укупно 5 доза, почев од дана палпације тумора, на трећи дан. По истој схеми интраперитонеално је апликована и цисплатина у дози од 6mg/kg, растворена у 200 μ l физиолошког раствора.



Фигура 6: Схематски приказ плана *in vivo* експеримента

3.8.4 Одређивање величине и волумена тумора

Раст палпабилног примарног карцинома дојке праћен је свакодневно, током 24 дана, уз истовремено морфометријско одређивање величине тумора коришћењем нониуса.

Запремина тумора је израчуната по формули (311):

$$V(\text{mm})^3 = \frac{L (\text{највећи пречник}) \times W^2 (\text{најмањи пречник})}{2}$$

Тридесет шестог дана од убризгавања малигнух ћелија, мишеви су жртвовани цервикалном транслокацијом. Узета је крв за биохемијске анализе, као и следећи органи: срце, плућа, јетра и по један бубрег. Изоловани органи одложени су 24 сата у фиксатив, у волумену 10 пута већем од волумена изолованих органа. Фиксатив омогућава очување структурних карактеристика ткива, односно спречава аутолизу ћелија, која би наступила услед дехидратације ткива, осмотског бубрења и пуцања ћелијске мембране. Добра фиксација омогућава да ткиво издржи касније припремне поступке током финалне обраде препарата за микроскопирање. У обради материјала као фиксатив коришћен је 4% формалин. Након 24 сата, од изолованих органа, узимани су најкарактеристичнији исечци ткива, постављани у пластичне касетице и подвргнути даљој обради за касније микроскопирање.

3.8.5 Обрада материјала и бојење хематоксилином и еозином

Уследила је обрада у аутоматизованом ткивном процесору, аутотехнику а затим и калуљење у парафин. Парафин омогућава сечење на пресеке између 4 и 5 микрометра. Обзиром да ткиво садржи воду због чега не може да се уведе у парафин, даља обрада подразумевала је дехидратацију, односно уклањање воде из ткива. Дехидратација је учињена испирањем у растућим концентрацијама етил алкохола: два пута у трајању по 5 минута у 86% алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу и 5 минута у 100%, апсолутном алкохолу. Ткиво је затим просветљено, потапањем у органски растварач, ксилол, у трајању од једног минута, који представља медијум у коме се парафин раствара, а који омогућава прозирност ткива и видљивост структура ћелије под микроскопом. Ткиво је даље третирано растопљеним парафином, загрејаним на на +56°C у диспензеру парафина и стављено у металне модлице. На модлице је стављен носач калуца и још мало наливен парафин. Тако спремне модлице спуштене су на хладну плочу, да се хладе до очврснућа парафина. Након тога, носачи су склоњени из модлица, а калуци тримовани, односно финално обликовани.

Да би се ткиво анализирано под микроскопом, мора да буде танко и обојено. Прво су калуци монтирани на инструмент за сечење, који се назива микротом, након чега су сечени ткивни пресеци. Спуштањем пресека на површину воденог купатила, које има температуру нешто нижу од тачке кључања парафина, набрани пресеци су исправљени и нанесени на предметне плочице. Уследила је рехидратација ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: два пута у трајању од 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 86% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води, како би се омогућио продор боја у ткивне пресеке. Након испирања препарати су обојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich*) у трајању од 10 минута, а затим испрани у дестилованој и под млазом текуће воде, како би се вишак боје уклонио. Обојени ткивни пресеци још једном су дехидратисани кроз серију растућих алкохолних раствора, а затим су на ткивне пресеке нанесени канада балзам (*Centrohem, Србија*) и стављене покровне љуспице.

Ткивни пресеци су обележени и касније анализирани светлосним микроскопом (*Olympus BX51*) опремљеним дигиталним фотоапаратом. Степен оштећења паренхима јетре, бубрега, срца и плућа одређиван је семиквантитативно на основу следећих патохистолошких скорова (Табела 1-4) :

Табела 1: Патохистолошки скор оштећења јетре (312)	
Систем скоровања хепатотоксичности	
А. Перипортални или перисептални хепатитис (<i>pieceteal</i> некроза)	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	Благ (фокални, неколико порталних поља)
2	Умерен (фокални, више порталних поља)
3	Средње тежак (континуиран, <50% паренхима јетре)
4	Тежак (континуиран, >50% паренхима јетре)
Б. Конфлуентна некроза	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	Фокална конфлуентна некроза
2	Некроза зоне 3 у неколико поља
3	Некроза зоне 3 у већини поља

4	Некоза зоне 3+ местимична порто-централна <i>bridging</i> некроза
5	Некоза зоне 3+ мултипла порто-централна <i>bridging</i> некроза
6	Панацинарна или мултицинарна некроза
В. Фокална литичка некроза и инфламација	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	1 фокус / поље (10X увељичање)
2	2-4 фокуса / поље (10X увељичање)
3	5-10 фокуса / поље (10X увељичање)
4	Више од 10 фокуса / поље (10X увељичање)
Г. Портална инфламација	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	Блага, неколико порталних подручја
2	Умерена, више порталних подручја
3	Средње тешка, већина порталних подручја
4	Тешка, сва портална подручја

Табела 2: Патохистолошки скор оштећења бубрега (313)	
Систем скоровања нефротоксичности	
А. Патологија гломерула	
1. Сегментна атрофија гломеула	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
2. Перигломерулана инфилтрација моноклеарних леукоцита	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
3. Хиперцелуларност гломерула	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
4. Акумулација мезангиалијског матрикса	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
5. Хипертофија паријеталних епителних ћелија	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега

3	У > 50% ткива бубрега
6. Перигломеруларна фиброза	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
7. Гломерулосклероза	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
Б. Тубулоинтерстицијална патологија	
1. Фокална тубуларна базофилија	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
2. Интерстицијална инфилтрација мононуклеарних леукоцита	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
3. Акутна тубуларна епителна некроза	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
4. Губитак тубула	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
5. Атрофија и дилатација тубула и накупљање протеина у тубулима	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега
6. Интерстицијална фиброза	
0	Без патолошког налаза
1	У < 10% ткива бубрега
2	У 10-50% ткива бубрега
3	У > 50% ткива бубрега

Табела 3: Патохистолошки скор оштећења срца (313)

Систем скоровања кардиотоксичности**А. Вакуолизација кардиомиоцита**

0 Нормалан хистолошки налаз

1	1-2 вакуолизована миофибрила/ Поље (20X увеличање)
2	3-4 вакуолизована миофибрила/Поље (20X увеличање)
3	4 или више вакуолизована миофибрила / Поље (20X увеличање)
Б. Инфилтрација мононуклеарних ћелија	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	1 кластер ћелија / Поље (20X увеличање)
2	2 кластера ћелија/ Поље (20X увеличање)
3	3 или више кластера ћелија / Поље (20X увеличање)
В. Интерстицијална фиброза са дезорганизацијом или атрофијом миофибрила	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	Један фокус / Поље (20X увеличање)
2	Два фокуса / Поље (20X увеличање)
3	Три или више фокуса / Поље (20X увеличање)

Табела 4: Патохистолошки скор оштећења плућа (314)

Систем скоровања оштећења плућног паренхима	
А. Фиброза	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа
Б. Поља пнеумоније	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа
В. Хиперплазија или хипертрофија пнеумоцита тип I & II	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа
Г. Задебљање алвеоларног септума	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа
Д. Ателектаза	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа
Е. Алвеолитис	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа

Ж. Компензаторни емфизем	
0	Нормалан хистолошки налаз
1	5–25% паренхима плућа
2	26–50% паренхима плућа
3	>50% паренхима плућа

3.8.6 Испитивање токсичних ефеката новосинтетисаних комплекса платине

Непосредно након жртвовања мишевима је узимана крв из трбушне аорте, центрифугирана 20 минута на 12000 обртаја на 4°C. Након центрифугирања, крвни елементи су се исталожили на дну сваке од епендорфица. Серум сваког појединачног миша је издвојен за даље одређивање биохемијских параметара: урее, креатинина и концентрације аспартат и аланин трансминаза: аспартат трансминазе (енгл. *Aspartate aminotransferase*, AST) и аланин трансминазе (енгл. *Alanine aminotransferase*, ALT). Специфични колориметријски китови су коришћени за мерење концентрације креатинина, урее и трансминаза из серума, према препорукама произвођача. Измерене концентрације здравих мишева, упоређиване су у односу на мишеве који су третирани новосинтетисаним комплексом Pt(II)-Pt3 и мишеве третиране цисплатином.

3.9 Варијабле мерене у студији

Независне варијабле: апликација новосинтетисаних мононуклеарних комплекса платине (II), [Pt(L)(5,6-ероку-1,10-phen)] (L - бидентантно кординовани анјон малонске (mal), 2-метилмалонске (Me-mal), 2,2-диметилмалонске киселине (Me₂-mal) и 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (cbdca), и 5,6-ероку-1,10-phen - бидентантно кординовани 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин).

Зависне варијабле: вијабилност ћелија, примарни тумор дојке (морфометријско одређивање величине тумора).

Збуњујуће варијабле: нису постојале.

3.10 Статистичка обрада података

За статистичку обраду података користили смо SPSS програм, верзију 22. Пре започињања статистичке анализе, испитивана је правилност расподеле добијених вредности преко *Kolmogorov-Smirnov* теста. За вредности са правилном расподелом, користили смо параметарски *Student's t* тест. Непараметарски *Mann-Whitney* тест користили смо за вредности са неправилном расподелом. Резултати истраживања су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (SD) и стандардна грешка (SE). Разлика је била статистички значајна у добијеним вредностима између група уколико је износила * $p < 0,05$, док је за статистички веома значајну разлику узета вредност ** $p < 0,01$.

4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Синтеза мононуклеарних Pt(II) комплекса, Pt1–Pt4

Реакција синтезе четири нова мононуклеарна комплекса платине, Pt(II), опште формуле $[\text{Pt}(\text{L})(5,6\text{-epoxy-1,10-phen})] \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где је L бидентатно координован анион малонске киселине (mal, у комплексу Pt1), 2-метилмалонске (Me-mal, у комплексу Pt2), 2,2-диметилмалонске (Me₂-mal, у комплексу Pt3) и 1,1-циклобутандикарбоксилне (cbdca, у комплексу Pt4) киселине, а 5,6-epoxy-1,10-phen бидентатно координован 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин, приказани су на схеми 1. За добијање $[\text{Pt}(\text{L})(\text{DMSO})_2]$ комплекса, *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ комплекс је помешан са еквимоларном количином соли сребра(I) одговарајуће дикарбоксилне киселине (Ag_2L) у воденом раствору. Након уклањања исталоженог AgCl, у раствор $[\text{Pt}(\text{L})(\text{DMSO})_2]$ додата је еквимоларна количина 5,6-epoxy-1,10-phen лиганда. Pt1-Pt4 комплекси су добијени као аморфне прашкасте супстанце из воденог раствора, након хлађења у фрижидеру. Кристални облик ових комплекса није се могао добити чак ни употребом различитих растварача (воде, метанола, ацетона, хлороформа, диметилформамида), док су кристали безводног Pt3 комплекса добијени рекристализацијом из хлороформа.

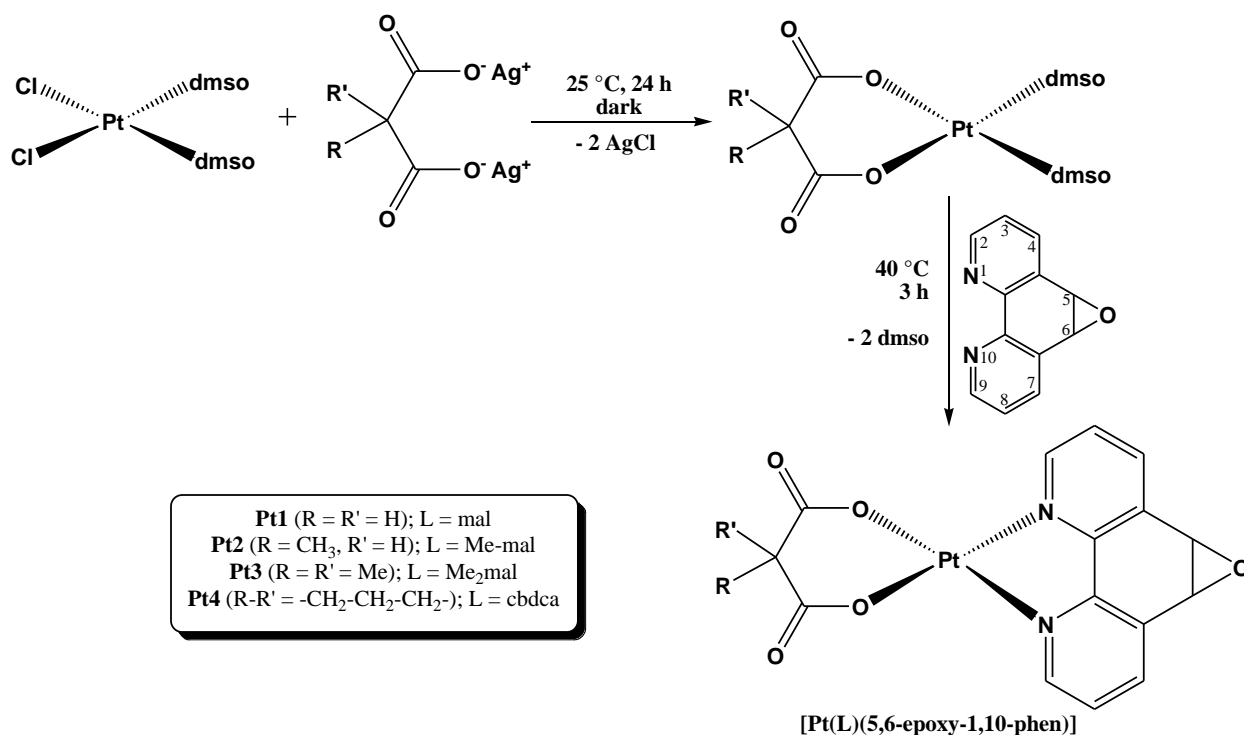


Схема 1: Схематски приказ реакције синтезе Pt1-Pt4 комплекса

4.2 Карактеризација мононуклеарних Pt(II) комплекса, Pt1–Pt4

Степен чистоће новосинтетисаних комплекса платине(II), Pt1-Pt4 проверен је елементалном микроанализом и различитим спектроскопским техникама: UV-Vis, IR и NMR (^1H и ^{13}C) спектроскопијом.

4.2.1 Елементална микроанализа комплекса Pt1

$[\text{Pt}(\text{mal})(5,6\text{-epoxy-1,10-phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7\text{Pt}$, комплекс Pt1, (Mr = 529,36):

Израчунато за C, 34,03; H, 2,67; N, 5,29%. Нађено: C, 34,17%; H, 2,65%; N, 5,32%.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, dms o-d_6 , δ , ppm): 1.23 (s, 2H, mal), 5.09 (s, 2H, H5, H6), 7.98 (dd, 2H, H3, H8), 8.73 (d, 2H, H4, H7), 8.82 (dd, 2H, H2, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, dms o-d_6 , δ , ppm): 45 (CH $_2$, mal), 55 (C5, C6), 128 (C3, C8), 134 (C4a, C6a), 141 (C4, C7), 148 (C2, C9), 157 (C1a, C10a), 175 (COOH).

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3412 (O-H); 1634, (COO); 1399, 1379 (C-N, C-O); 804 (C-O-C).

UV-vis (H_2O , λ_{max} , nm): 260 ($\epsilon = 32,3\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 313 ($\epsilon = 8,7\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 327 ($\epsilon = 10,5\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.2 Елементална микроанализа комплекса Pt2

$[\text{Pt}(\text{Me-mal})(5,6\text{-epoxy-1,10-phen})]\cdot \text{H}_2\text{O} = \text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{Pt}$, комплекс Pt2, (Mr = 525,37):

Израчунато: C, 36,58; H, 2,69; N, 5,33%. Нађено: C, 36,45; H, 2,75; N, 5,24%.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, dms o-d_6 , δ , ppm): 1,08 (d, 3H, CH $_3$ Me-mal), 3,79 (d, H, CH Me-mal), 5,08 (s, 2H, H5, H6), 7,96 (dd, 2H, H3, H8), 8,73 (dd, 2H, H4, H7), 8,80 (dd, 2H, H2, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, dms o-d_6 , δ , ppm): 14 (CH $_3$ Me-mal), 51 (CH, Me-mal), 54 (C5, C6), 128 (C3, C8), 133 (C4a, C6a), 142 (C4, C7), 147 (C2, C9), 152 (C1a, C10a), 175 (COOH).

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3455 (O-H); 1659, 1626 (COO); 1379 (C-N, C-O); 806 (C-O-C).

UV-vis (H_2O , λ_{max} , nm): 262 ($\epsilon = 25,7\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 312 ($\epsilon = 8,1\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 326 ($\epsilon = 10,5\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.3 Елементална микроанализа комплекса Pt3

$[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{-mal})(5,6\text{-epoxy-1,10-phen})]\cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7\text{Pt}$, комплекс Pt3, (Mr = 557,41)

Израчунато: C, 36,63; H, 3,25; N, 5,03%. Нађено: C, 36,87; H, 3,30; N, 5,09%.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, dms o-d_6 , δ , ppm): 1.55 (d, 6H, CH $_3$ Me $_2$ -mal), 5.09 (s, 2H, H5, H6), 7.98 (dd, 2H, H3, H8), 8.79 (m, 4H, H4, H7, H2, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, dms o-d_6 , δ , ppm): 26 (CH $_3$, Me $_2$ -mal), 52 (C, Me $_2$ -mal), 54 (C5, C6), 128 (C3, C8), 134 (C4a, C6a), 141 (C4, C7), 147 (C2, C9), 152 (C1a, C10a), 178 (COOH).

IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3521, 3430 (O-H); 1627, 1610 (COO); 1443, 1393, 1341 (C-N, C-O); 805 (C-O-C).

UV-vis (H_2O , λ_{max} , nm): 265 ($\epsilon = 23,9\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 313 ($\epsilon = 6,1\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 326 ($\epsilon = 8,5\cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2.4 Елементална микроанализа комплекса Pt4

[Pt(cbdca)(5,6-епoxy-1,10-phen)]·H₂O = C₁₈H₁₆N₂O₆Pt, комплекс **Pt4**, (M_r = 551.41):

Израчунато: C, 39,21; H, 2,92; N, 5,08%. Нађено: C, 39,36; H, 2,83; N, 5,21%. ¹H NMR (200 MHz, dms_o-d₆, δ, ppm); 1,72 (m, 2H, CH₂cbdca), 2,62 (m, 4H, CH₂cbdca), 5,08 (s, 2H, H5, H6), 7,97 (dd, 2H, H3, H8), 8,78 (m, 4H, H4, H7, H2, H9).

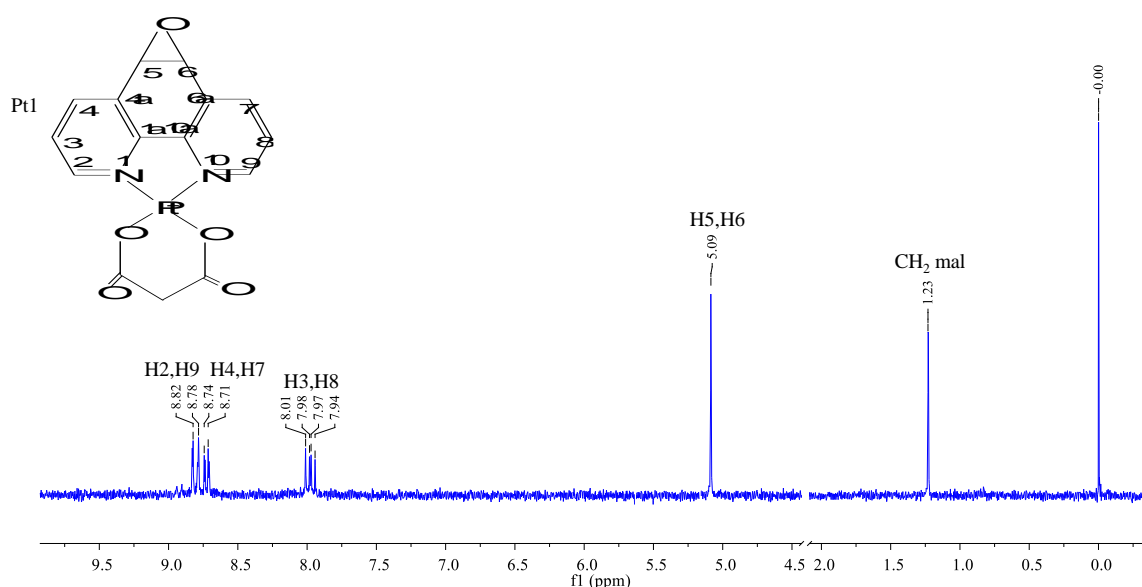
¹³C NMR (50 MHz, dms_o-d₆, δ, ppm): 15 (C3, cbdca), 30 (C2, C4 cbdca), 56 (C1, cbdca), 54 (C5, C6), 128 (C3, C8), 133 (C4a, C6a), 142 (C4, C7), 147 (C2, C6), 152 (C1a, C10a), 175 (COOH).

IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3437 (O-H); 1668, 1639 (COO); 1439, 1350 (C-N, C-O); 794 (C-O-C).

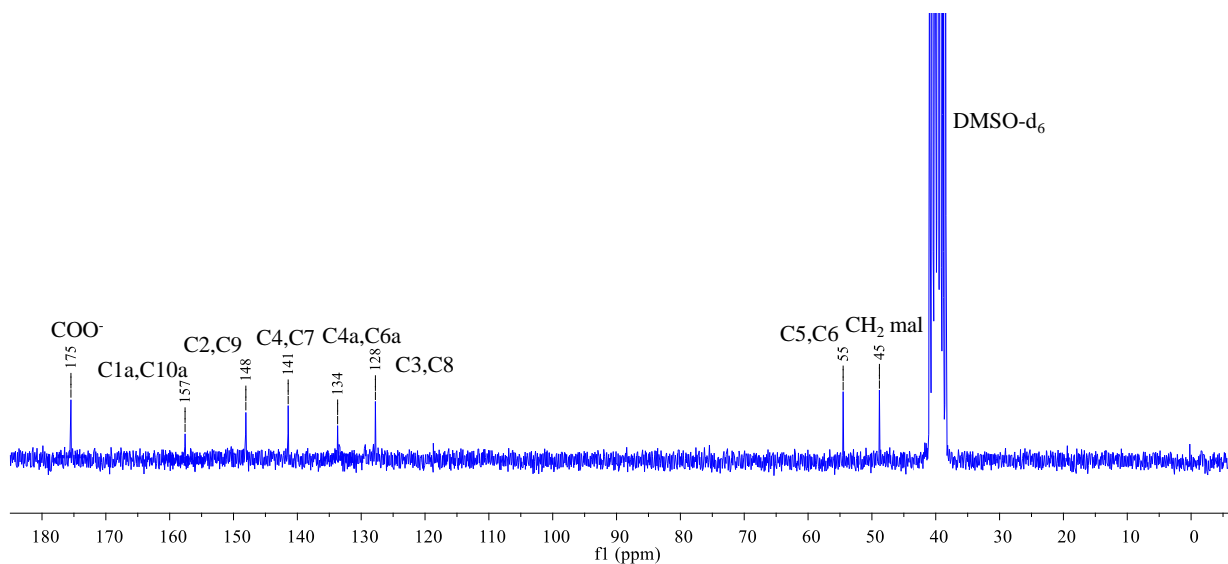
UV-vis (H₂O, λ_{max}, nm): 262 (ε = 22.0·10³ M⁻¹cm⁻¹), 312 (ε = 5.4·10³ M⁻¹cm⁻¹), 325 (ε = 8.5·10³ M⁻¹cm⁻¹).

4.2.5 ¹H и ¹³C NMR спектроскопска карактеризација Pt1–Pt4 комплекса

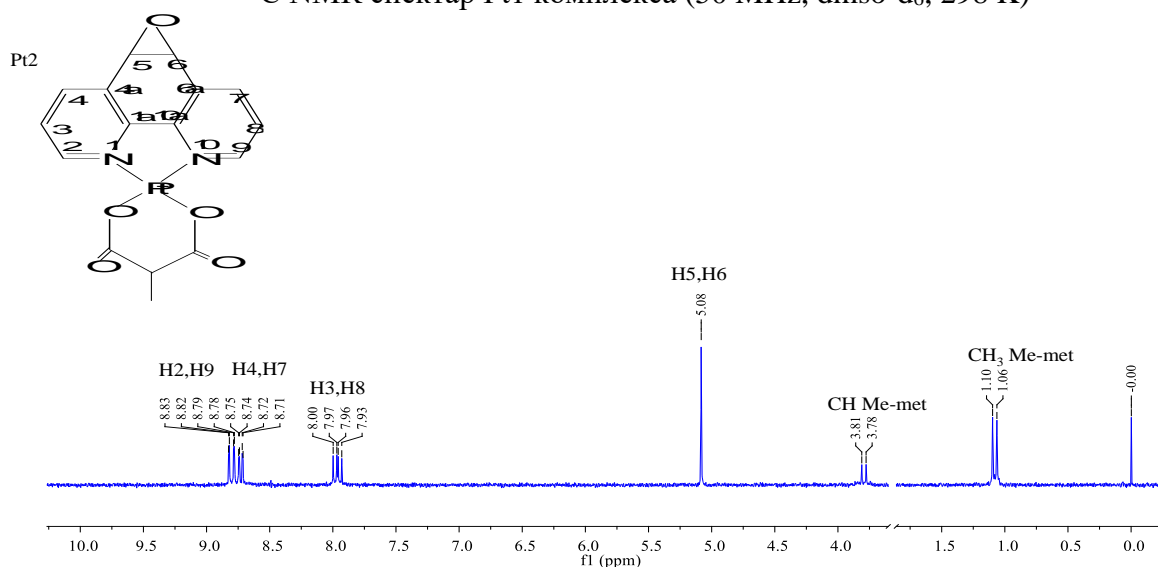
Нуклеарно-магнетно-резонанциони спектри, ¹H и ¹³C NMR, комплекса Pt1-Pt4 су снимљени на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу на *Varian Gemini-2000* NMR спектрофотометру. За припрему раствора за снимање ¹H и ¹³C NMR спектра као растварач је употребљен деутеријум оксид (D₂O) и натријум-3-(триметилсилил)-пропионат-2,2,3,3-*d*₄ (TSP) као стандард. На основу промене у померањима сигнала протона или ¹³C угљеникових атома лигананда у ¹H и ¹³C NMR спектрима, утврђује се њихова координација за Pt(II) јон. На Слици 1 приказани су ¹H и ¹³C NMR спектри Pt1-Pt4 мононуклеарних комплекса платине(II).



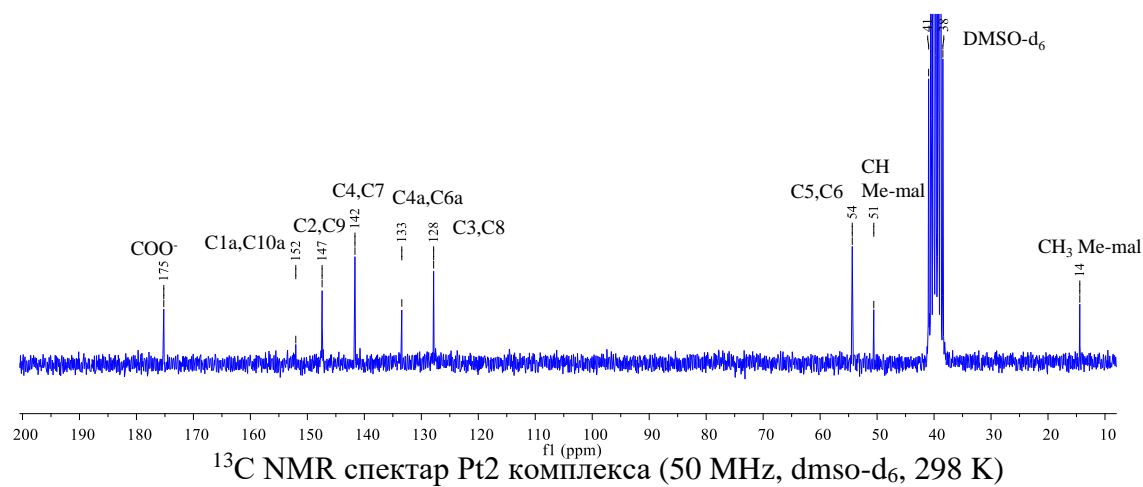
¹H NMR спектар Pt1 комплекса (200 MHz, dms_o-d₆, 298 K)



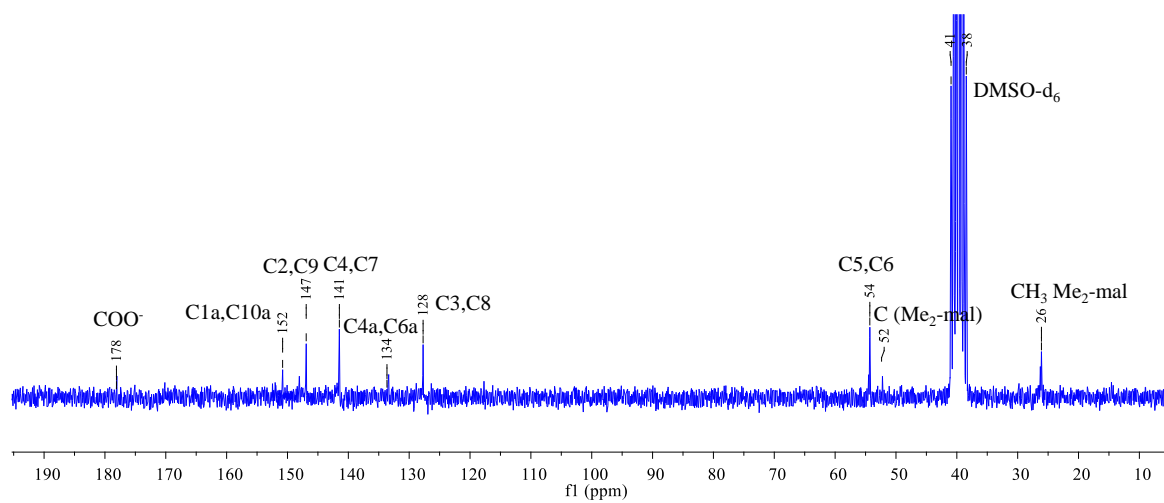
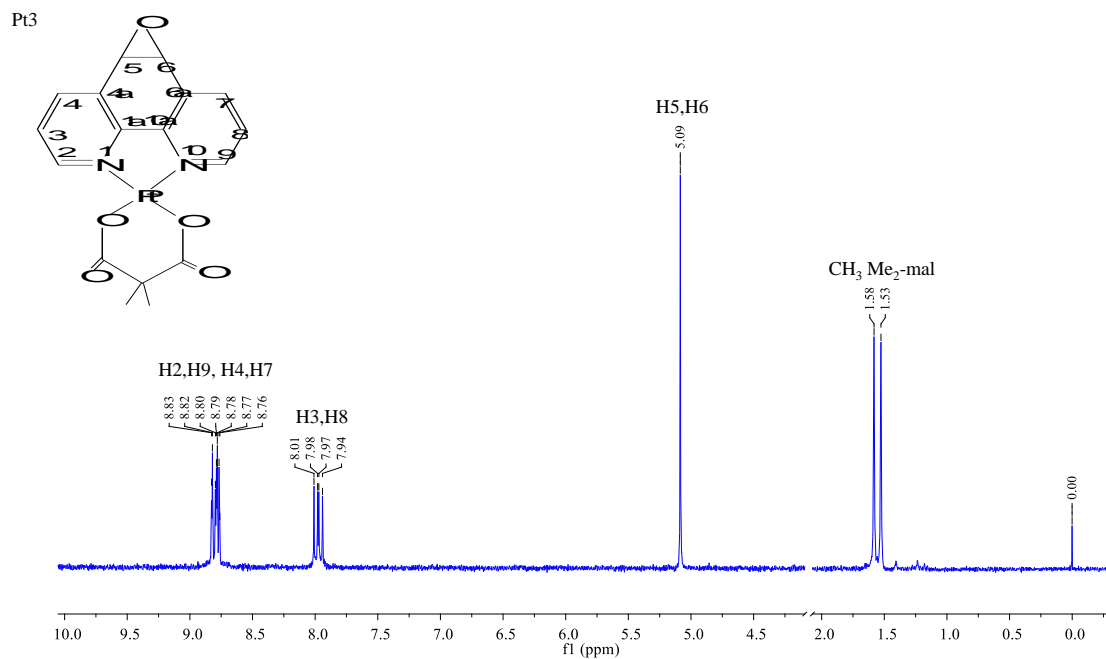
^{13}C NMR спектар Pt1 комплекса (50 MHz, dmsO-d_6 , 298 K)

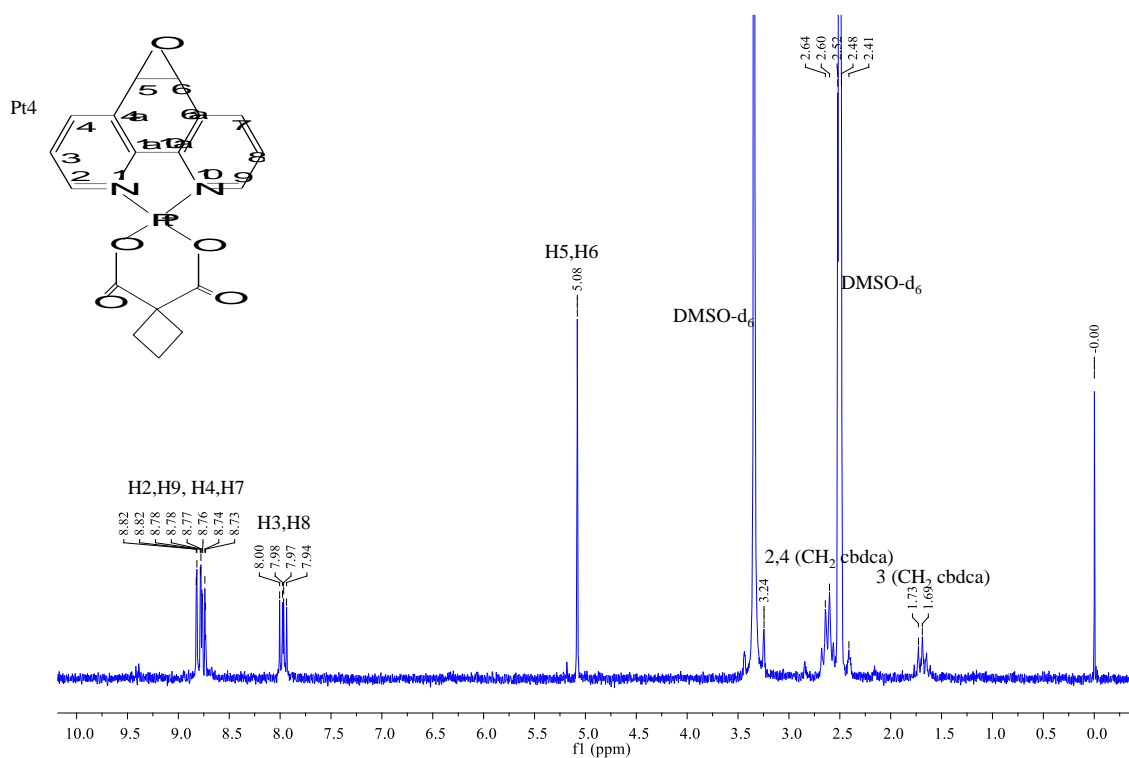


^1H NMR спектар Pt2 комплекса (200 MHz, dmsO-d_6 , 298 K)

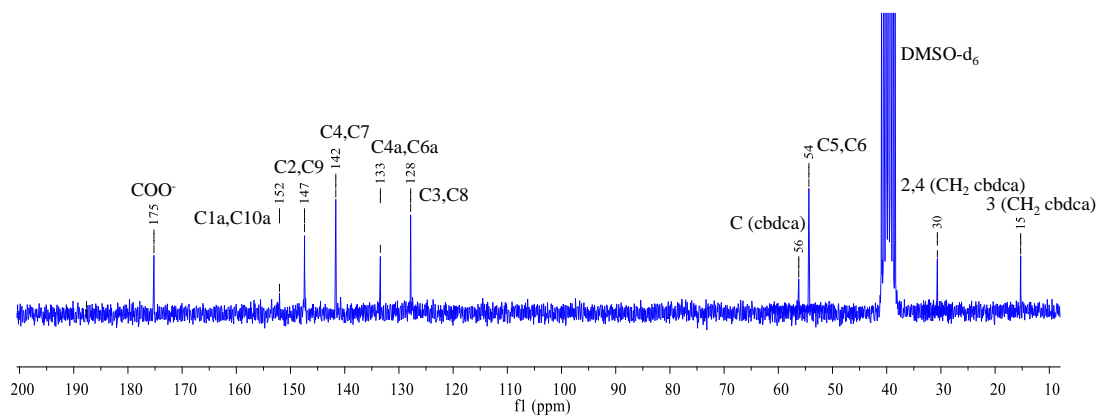


^{13}C NMR спектар Pt2 комплекса (50 MHz, dmsO-d_6 , 298 K)





¹H NMR спектар Pt4 комплекса (200 MHz, dmsO-d₆, 298 K)



¹³C NMR спектар Pt4 комплекса (50 MHz, dmsO-d₆, 298 K)

Слика 1. ¹H и ¹³C NMR спектри синтетисаних комплекса платине(II), Pt1–Pt4.

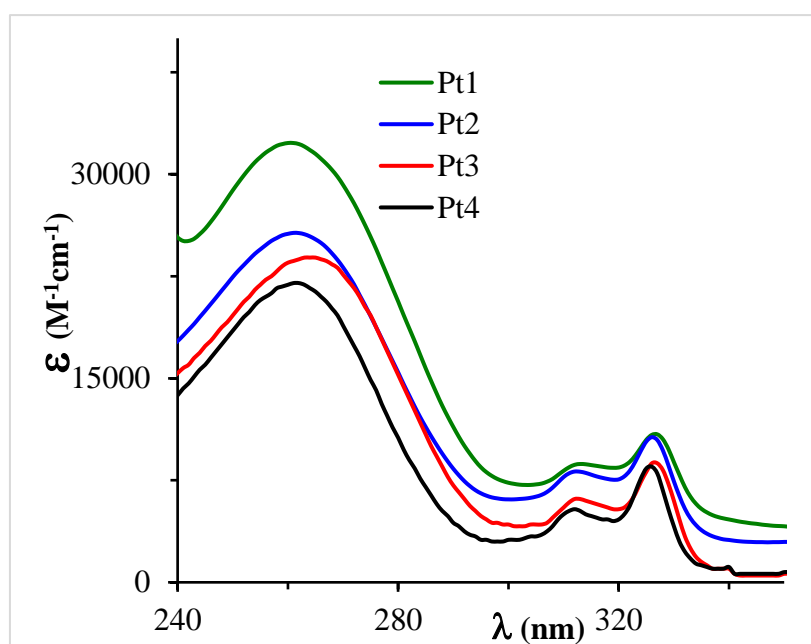
4.2.6 UV-vis спектрофотометријска карактеризација Pt1–Pt4 комплекса

Електронски апсорпциони (UV-vis) спектри снимани су на *Shimadzu double-beam* спектрофотометру који је опремљен хелијом за термостатирање, при чему су спектри снимани у опсегу таласних дужина 200 – 900 nm. Апсорпциони максимуми (λ_{\max}) у области 260 - 303 nm који се могу уочити потичу од $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза у одговарајућем *N*-хетероцикличном лиганду.

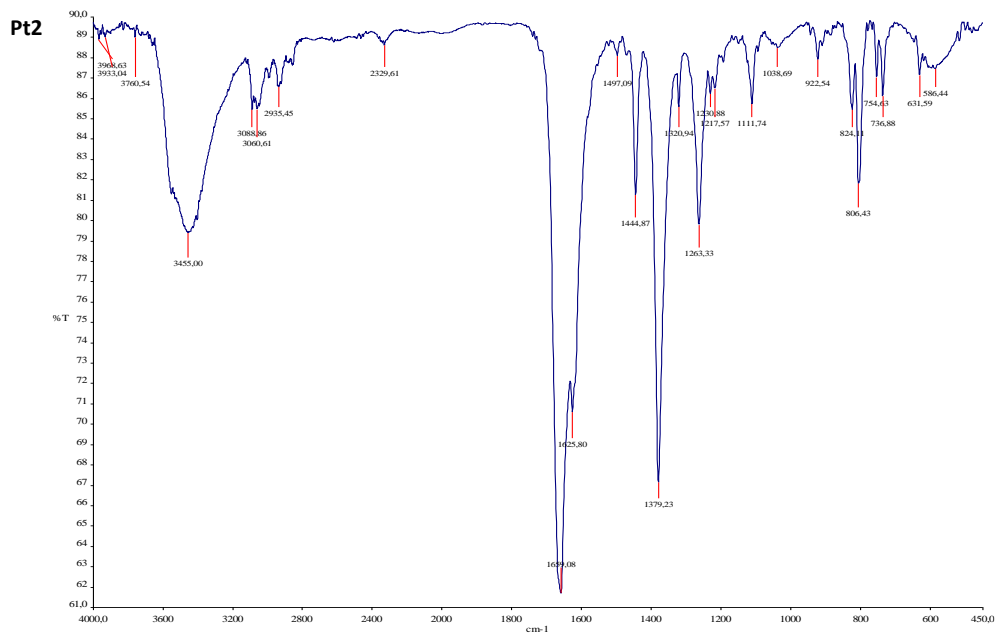
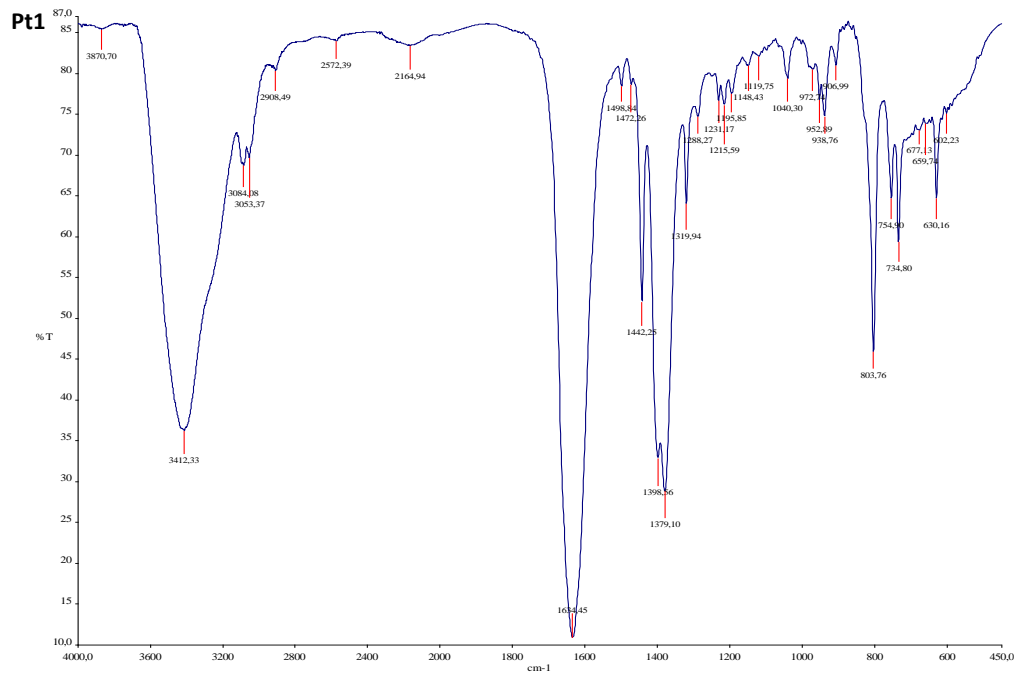
UV-Vis спектри комплекса Pt1-Pt4 снимљених у води, при концентрацији од $5 \cdot 10^{-5}$ M приказани су на фигури 7.

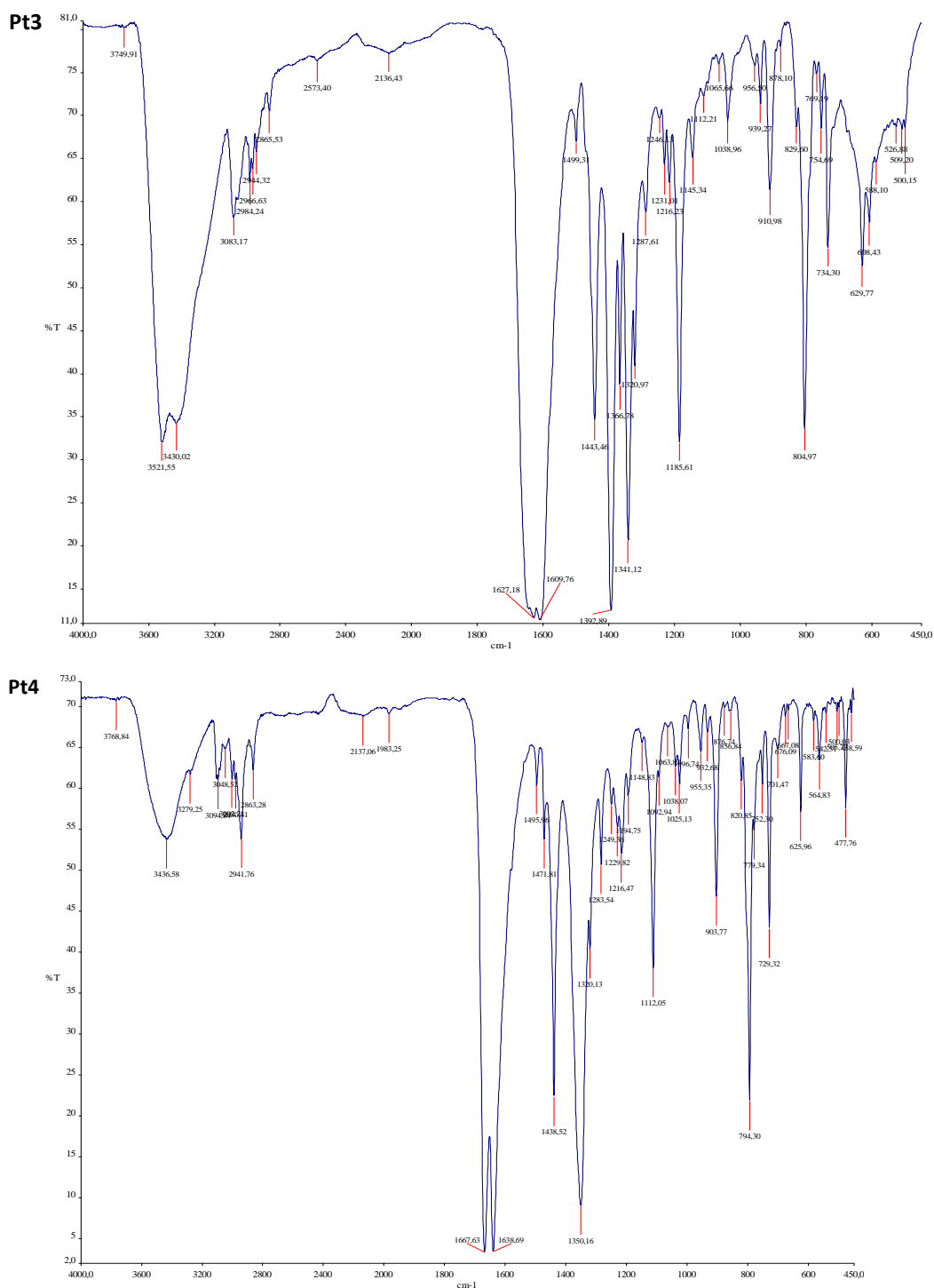
4.2.7 IR спектроскопска карактеризација Pt1–Pt4 комплекса

Инфрацрвени спектри синтетисаних Pt(II) комплекса снимљени су на Институту за хемију Природно-Математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на спектрофотометру *Perkin-Elmer FTIR 31725X*. IR спектри комплекса Pt1-Pt4 у чврстом стању снимљени су у опсегу од $4000\text{--}450\text{ cm}^{-1}$ и садрже карактеристичне траке које се могу приписати малонским киселинама као бидентатно координованим лигандима, као и бидентатно координованом 5,6-ероку-1,10-phen лиганду (Слика 2).



Фигура 7: UV-vis спектри Pt1–Pt4 комплекса снимљених у $5 \cdot 10^{-5}$ M воденом раствору.





Слика 2. IR спектри Pt1–Pt4 комплекса (KBr пилула, 298 K).

4.2.8 Рендгенска структурна анализа анхидрованог [Pt(Me₂-met)(5,6-ероху-1,10-phen)] (Pt3) комплекса

Рендгенска структурна анализа комплекса је приказана у табели 5. Кристали [Pt(Me₂-met)(5,6-ероху-1,10-phen)] (Pt3) су добијени растварањем приближно 3 mg комплекса у 5 mL хлороформа. Суспензија је лагано загревана на 40 °C током 20 мин, а затим

остављена још 20 мин да се охлади на собној температури и да се нерастворен прах слегне. Засићени раствор је декантован у другу бочицу и остављен делимично непокривен, како би растварач полако испарио преко ноћи. Тако добијени жути микрокристали били су погодни за рендгенску структурну анализу.

Табела 5. Кристалографски подаци за [Pt(Me₂-met)(5,6-epoxy-1,10-phen)] (Pt3) комплекс

Комплекс	Pt3
CCDC број	2143667
Емпиријска формула	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₅ Pt
Молекулска маса	521.39
Температура [K]	150.00(10)
Кристални систем	моноклиничан
Просторна група	P2 ₁ /n
a [Å]	11.8599(5)
b [Å]	9.3286(3)
c [Å]	14.1095(5)
α [°]	90
β [°]	98.243(3)
γ [°]	90
Запремина [Å ³]	1544.90(10)
Z	4
ρ _{calc} [g/cm ³]	2.242
M [mm ⁻¹]	9.115
F(000)	992.0
Величина кристала [mm ³]	0.03 × 0.03 × 0.02
Зрачење	Mo Kα (λ = 0.71073)
2θ опсег прикупљања података [°]	4.844 to 54.966
Index ranges	-15 ≤ h ≤ 15, -12 ≤ k ≤ 12, -17 ≤ l ≤ 17
Број сакупљених рефлексија	12372
Број независних рефлексија	3498 [R _{int} = 0.0323, R _{sigma} = 0.0308]
Data/restraints/parameters	3498/0/228
Квалитет уклапања F ²	1.028
Крајњи R индекси [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0191, wR ₂ = 0.0405
Коначни R индекси [сви подаци]	R ₁ = 0.0239, wR ₂ = 0.0421
Највећи дифракциони врх/укупно [e/Å ³]	0.73/-0.91

Рендгенска структурна анализа комплекса је вршена на основу мерења интензитета рефлексија помоћу „SuperNova” дифрактометра са „Atlas” детектором коришћењем софтвера *CrysAlis*, применом MoKα радијације (λ = 0,71073 Å) на температури -123 °C (150 K).

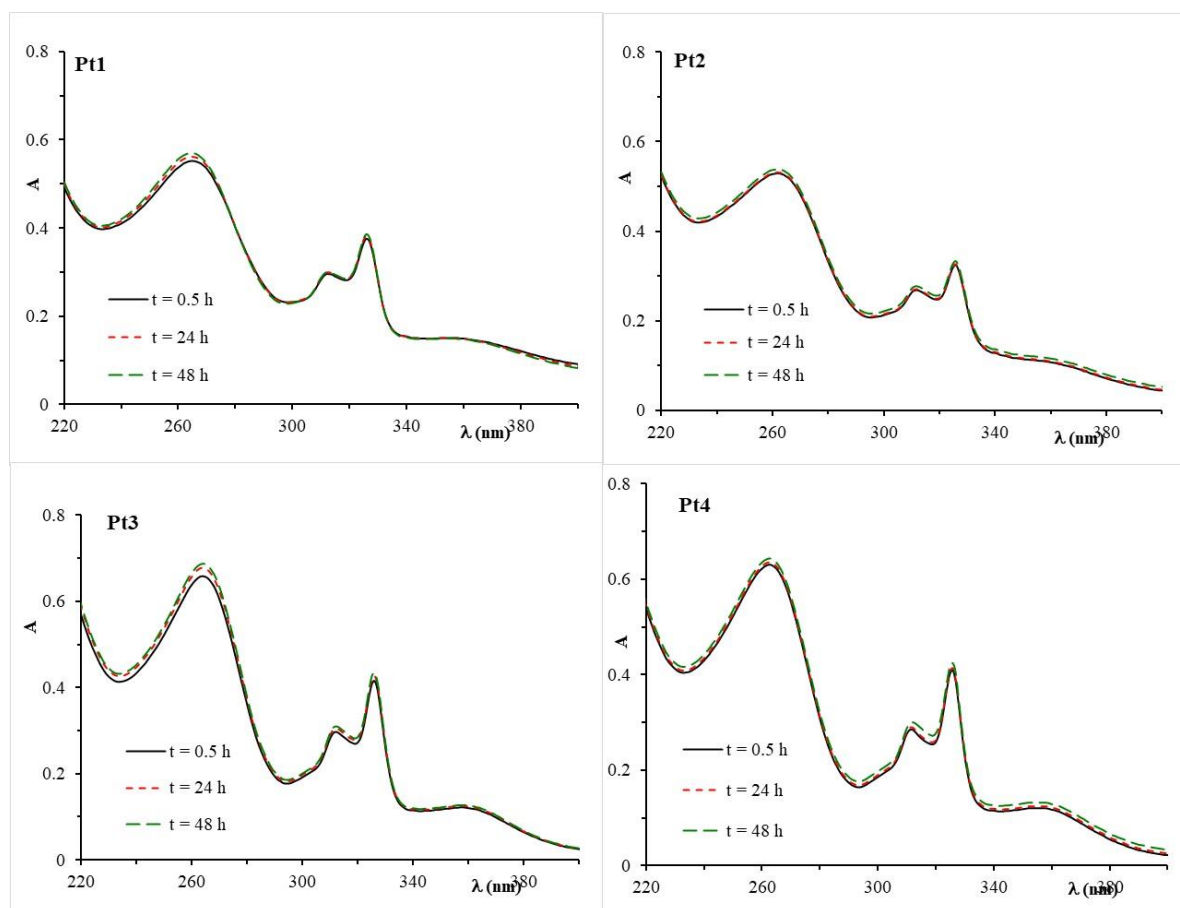
4.2.9 Стабилност комплекса Pt1-Pt4

Стабилност комплекса Pt1-Pt4 је испитивана UV-vis спектроскопијом у трајању од 48 сати. Раствори свих комплекса су припремљени у 0,01 М фосфатном пуферу, PBS-у као растварачу. Узорци су између мерења држани на собној температури и у мраку. Веома мале промене у интензитету максимума апсорпције примећене су након 48 сати (Фигура 8).

4.3 Интеракције мононуклеарних комплекса платине(II) са DNA

4.3.1 UV-Vis спектрофотометријска мерења

Електронска апсорпциона спектрофотометрија је метода за испитивање афинитета везивања комплекса јона метала са DNA или циљним протеином, обзиром да интеракција са DNA или циљним протеином узрокује промене у електронским



Фигура 8. Стабилност комплекса платине(II) праћена UV-vis спектрофотометријом у 0,01 М PBS при рН 7,40. Сва мерења су вршена у различитим временским интервалима и собној температури.

апсорпционим спектрима. На основу резултата апсорпционе спектроскопије може се предвидети тип и начин везивања (да ли је веза интеркалација или жлебно везивање), на основу тога што различите интеракције узрокују различите промене у максимуму апсорпције, у положају или у интензитету. Апсорпциони спектри комплекса Pt1-Pt4 са DNA су снимани при константној концентрацији комплекса и различитим односима комплекс/ DNA (r). Ради упоређивања афинитета везивања комплекса за CT-DNA, израчунате су унутрашње константе везивања (K_b) према једначини која је дата у одељку Материјал и методе, а приказане су у табели 6.

На основу добијених вредности K_b израчуната је промена *Gibbs*-ове енергије (ΔG) за комплексе Pt1-Pt4 применом следеће једначине: $\Delta G = -RT \ln K_b$ (Табела 6).

Табела 6. Константа везивања за DNA (K_a), *Stern-Volmer*-ова константа (K_{sv}) и број везујућих места, *Hil*-ов коефицијент (n) израчунати за комплексе Pt1-Pt4

Комплекс	K_{sv} ($10^4 M^{-1}$)	K_a ($10^4 M^{-1}$)	n
Pt1	2.0	3.2	1.1
Pt2	1.6	3.0	0.9
Pt3	1.5	2.6	0.8
Pt4	1.1	2.1	0.9

4.3.2 Флуоресцентна мерења

Интеракције мононуклеарних Pt(II) комплекса, Pt1-Pt4 са CT-DNA испитиване су и применом емисионе флуоресцентне спектроскопије у присуству EtBr. Етидијум бромид се користи како би се испитао начин везивања комплекса за CT-DNA јер ни комплекси нити сам CT-DNA не флуоресценцирају.

Раствор Pt(II) комплекса додаје се у раствор који је добијен мешањем раствора EtBr и CT-DNA у 1 : 1 молском односу, тако да однос концентрација Pt(II) комплекса и CT-DNA буде у опсегу од 0,0 до 0,9. За припремање наведених раствора користи се 0,01 M раствор фосфатног пуфера (pH = 7,4). У циљу испитивања компетитивних реакција интеракције Pt1-Pt4 комплекса и EtBr са CT-DNA, снимани су флуоресцентни спектри EtBr/ CT-DNA у присуству и одсуству испитиваних Pt(II) комплекса. Емисиони спектри су снимани у опсегу 550 – 750 nm, са екстинцијом на 527 nm и флуоресцентном емисијом на 612 nm.

Stern-Volmer-ова константа (K_{sv}) одређена је помоћу једначине: $I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$ [50], где су I_0 и I интензитети флуоресценције пре и након додавања Pt(II) комплекса у раствор EtBr/ CT-DNA, док је $[Q]$ концентрација Pt(II) комплекса. Вредности *Stern-Volmer*-ове константе (K_{sv}), константе стабилности (K_a), број везујућих места (n), унутрашње константе везивања (K_b) и промена *Gibbs*-ове енергије (ΔG) испитиваних Pt(II) комплекса са CT-DNA дате су у табелама 6 и 7.

Табела 7. Унутрашња константа везивања (K_b) и промена *Gibbs*-ове слободне енергије (ΔG) of Pt1–Pt4 complexes.

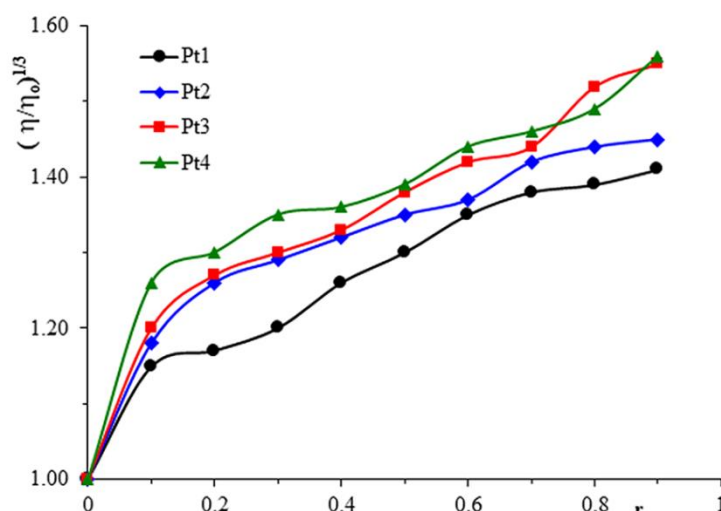
Complex	K_b (10^4 M^{-1})	ΔG (kJmol^{-1})
Pt1	6.0	-28.3
Pt2	4.0	-27.3
Pt3	2.0	-25.5
Pt4	1.0	-23.7

4.3.3 Мерење вискозитета

Мерење вискозитета је метода која се користи за додатно разјашњење начина интеракције нивосинтетисаних комплекса Pt(II) са CT-DNA. Вредности вискозитета су израчунате из уоченог времена протока раствора који садржи CT-DNA (t) коригованог за време протока самог пуфера (t_0), $\eta = (t - t_0)/t_0$. Подаци су представљени као $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у односу на вредност [комплекс]/[CT-DNA]. У раствор CT-DNA константне концентрације (10 μM) додавани су раствори сваког од испитиваних Pt(II) комплекса са растућим концентрацијама при чему се уочава благи пораст вискозитета CT-DNA (Фигура 9) што указује на интеркалацију испитиваних комплекса са CT-DNA која није тако изражена као што је примећено за класичне интеркалаторе.

4.4 Интеракције мононуклеарних комплекса платине(II) са говеђим серум албумином

Серум албумин је један од највише проучаваних протеина јер представља најчешћи протеин крвне плазме (315). Флуоресцентна спектроскопија је важан метод за проучавање структуре и динамике биомакромолекула. Смањење интензитета флуоресценције услед промене околине око флуорофора, тј. триптофана, услед координације протеина за комплекс, може открити природу реакције везивања (316). За раствор говеђег серум албумина карактеристична је интензивна



Фигура 9. Ефекат повећања концентрације раствора Pt1-Pt4 комплекса на релативну вискозност CT-DNA на собној температури, [CT-DNA] = 10 μM, r = [комплекс]/[CT-DNA].

флуоресцентна емисија на $\lambda_{em,max} = 352$ nm, и на 295 nm када је ексцитован (317). У овом истраживању, емисиони спектри флуоресценције BSA на таласној дужини екситације од 295 nm снимани су у одсуству и присуству различитих концентрација раствора комплекса Pt1-Pt4. Евидентно је да је додавање раствора комплекса Pt1-Pt4 у раствор BSA изазвало значајно смањење интензитета флуоресценције BSA.

У циљу проучавања механизма гашења флуоресценције између Pt(II) комплекса и BSA, израчунате су динамичка константа гашења K_{sv} и константа брзине гашења флуоресценције биомолекула k_q , помоћу *Stern-Volmer*-ове једначине. Вредности ових константи, као и константи везивања комплекса за BSA су дате у табели 8.

Табела 8. Вредности динамичке константе гашења (K_{sv}) и константе брзине гашења флуоресценције биомолекула (k_q), као и број места везивања (n) изведене за реакцију комплексе Pt1–Pt4 са BSA.

Комплекс	K_{sv} (10^4 M ⁻¹)	k_q (10^{12} M ⁻¹ s ⁻¹)	K_a (10^6 M ⁻¹)	n
Pt1	2.3	2.3	0.1	1.1
Pt2	2.2	2.2	0.1	1.1
Pt3	15.0	15.0	1.3	1.2
Pt4	6.6	6.6	1.1	1.1

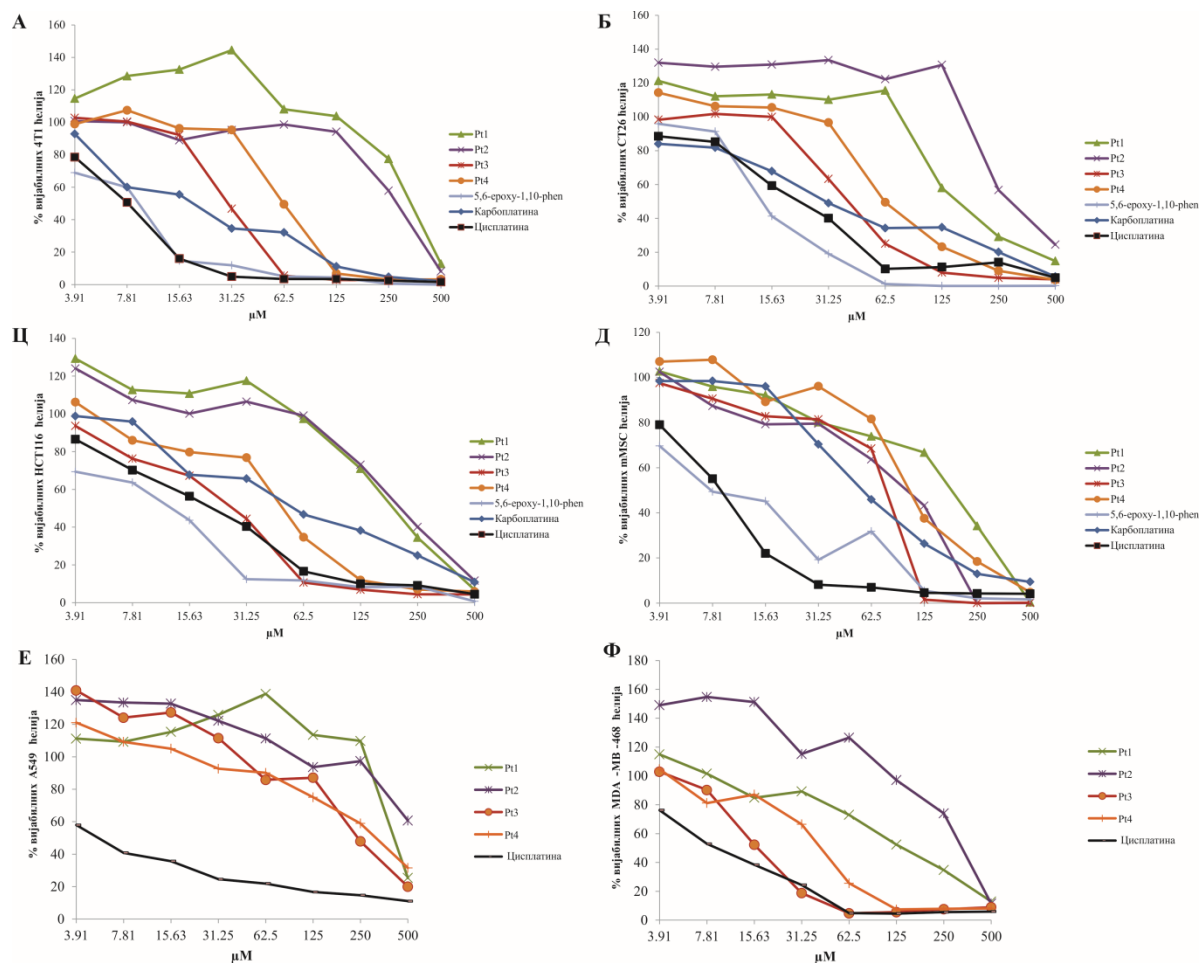
4.5 Мононуклеарни 5,6 епоксидно-1,10 фенантролински комплекси платине (Pt1-4) показују антитуморску активност

МТТ је колориметријски тест којим се мери активност митохондријалне редуктазе, активне само у вијабилним ћелијама и коришћен је за евалуацију цитотоксичког ефекта новосинтетисаних мононуклеарних комплекса платине (Pt1-4) на ћелијским линијама: карцинома дојке миша (4Т1), карцинома колоректума миша (СТ26), карцинома колоректума човека (НСТ 116), карцинома плућа (А549) и карцинома дојке (MDA-MB-468) и нетуморским, мезенхималним матичним ћелијама миша и упоређиван са цитотоксичношћу цисплатине. Поменуте ћелијске линије третиране су новосинтетисаним комплексима Pt(II) током 48 сати у концентрационом рангу 3.9 -500 микромола по литру. Анализа је показала да новоисинтетисани комплекси платине Pt1-4, смањују вијабилност туморских ћелија свих испитиваних линија. Цитотоксичка активност је дозно зависна, односно вијабилност ћелија опада са повећањем концентрације испитиваних комплекса (Фигура 10А-Ф).

При већим концентрацијама (250-500 $\mu\text{mol/l}$) цитотоксична активност комплекса Pt3 и Pt4 на туморске ћелије је слична, док је при нижим концентрацијама (3.91-125 $\mu\text{mol/l}$) активност Pt3 комплекса на туморске ћелије виша у односу на активност Pt4. Показано је да је цитотоксичка активност Pt3 комплекса на испитиваним туморским ћелијама већа, у поређењу са осталим новосинтетисаним комплексима платине (Pt1, Pt2 и Pt4), односно да има израженији антитуморски ефекат на третиране туморске ћелије у односу на друге испитиване комплексе.

Даље смо испитивали цитотоксичну активност новосинтетисаних Pt(II) комплекса на нетуморским ћелијама, односно мишјим мезенхималним матичним ћелијама. Сви испитивани комплекси платине (Pt1-4) смањили су вијабилност матичних ћелија на дозно зависан начин (Фигура 10Д). Новосинтетисани комплекси платине показали су низак цитотоксички ефекат на мезенхималне матичне ћелије при нижим концентрацијама (Фигура 10Д). У концентрацијама 15.63 до 125 $\mu\text{mol/l}$ Pt3 је показао нижи цитотоксички ефекат на мезенхималне матичне ћелије у поређењу са цитотоксичким ефектом на линије туморских ћелија (4Т1 и СТ26). Фигура 10Е и 10Ф приказује цитотоксични ефекат испитиваних комплекса Pt(II) на ћелијске линије хуманог карцинома плућа (А549) и хуманог карцинома дојке (MDA-MB-468).

Вредности инхибиторних концентрација (IC50) за новосинтетисане комплексе (Pt1-4) приказане су у табели 9. На основу вредности инхибиторних концентрација, цитотоксична активност Pt3 комплекса на 4Т1 и СТ26 туморске ћелије је виша у односу на друге новосинтетисане комплексе. Најизраженији цитотоксични ефекат детектован је на линијама туморских ћелија НСТ116 и MDA-MB-468.



Фигура 10. Цитотоксичност испитиваних мононуклеарних комплекса платине Pt1-4. **А:** ефекат на ћелијску популацију 4T1; **Б:** ефекат на ћелијску популацију CT26; **Ц:** ефекат на ћелијску популацију HCT116; **Д:** ефекат на популацију мезенхималних матичних ћелија, **Е:** ефекат на ћелијску популацију A549; **Ф:** ефекат на ћелијску популацију MDA-MB-468 након излагања испитиваним комплексима платине Pt1-4, лиганду, карбоплатини и цисплатини током 48 сати, мерено МТТ тестом. Подаци су приказани као средње вредности добијене из три независна експеримента.

Табела 9. Вредности IC₅₀ (μM) комплекса (Pt1-4), лиганда, карбоплатине и цисплатине за ћелијске линије 4T1, CT26 и HCT116, A549, MDA-MB-468 и мезенхималне матичне ћелије, одређене МТТ тестом

Испитивана супстанца	IC ₅₀ ± SEM (μM)					
	4T1	CT26	HCT116	A549	MDA-MB-468	mMSC
Pt1	351.1±2.5	205.4± 2.4	202.7±3.3	467.6±5.2	127.4±3	218.2±5.2
Pt2	291.9±2.0	365.14±3.6	233.2±3.1	1548.5±5.5	342.7±4	106.5±3.3
Pt3	35.6± 0.2	45.2±0.4	25.3±0.1	304.5±4.9	28.5±1.6	69.6±0.4
Pt4	60.2±1.1	73.4±1.1	45.0±0.7	387.2±4.3	41.5±1.9	107.1±4.7
5,6-епокси-1,10-phen лиганд	8.9±0.4	18.7±0.6	12.9			13.7±0.3
Карбоплатина	26.4±2.9	33.1±1.9	40.8±2.7			32.7±2.0
Цисплатина	8.5±0.8	11.7±0.8	24.9±0.8	3.7±0.8	5.7±0.8	7.8±0.9

Цисплатина, карбоплатина и 5, 6 епокси 1,10 дихидро фенантролонски лиганд показују виши цитотоксички потенцијал против туморских ћелија, у односу на новосинтетисане комплексе платине (Pt 1-4). Такође, цитотоксичка активност цисплатине, карбоплатине и 5,6-епокси-1,10-дихидро фенантролинског лиганда на мезенхималне матичне ћелије миша, виша је у односу на новосинтетисане комплексе платине (Pt1-4).

Израчунавањем индекса селективности, који је израчунат по формули : IC_{50mMSC}/IC_{50} (туморских ћелија), највиши степен селективности показао је новосинтетисани комплекс Pt3 као што је приказано у табели 10, те је у даљим експериментима испитивана биолошка активност само Pt3 комплекса.

Табела 10. Индекс селективности комплекса платине (Pt1-4), лиганда, карбоплатине и цисплатине третираних ћелијских линија 4T1 и CT26.

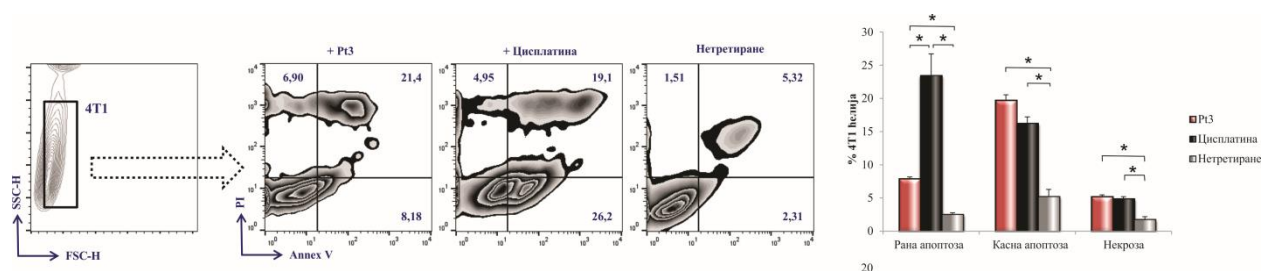
Испитивана супстанца	Индекс селективности ($IC_{50 mMSC}/IC_{50}$)	
	4T1	CT26
Pt1	0.6	1.1
Pt2	0.4	0.3
Pt3	1.9	1.5
Pt4	1.8	1.4
5,6-епокси-1,10-фен лиганд	1.5	0.7
Карбоплатина	1.2	1.0
Цисплатина	0.9	0.7

Подаци су приказани као средње вредности. Стандардна грешка је мања од 0.01 и није приказана у табели 10. На основу ових налаза, за даље анализе користили смо само Pt3 комплекс.

4.6 Новосинтетисани Pt3 комплекс стимулише апоптоску смрт ћелија

Способност Pt3 комплекса да стимулише апоптозу туморских ћелија, испитивана је методом проточне цитометрије, бојењем анексином V (Ann V) и пропидијум јодидом (PI). Анексин V-FITC је флуоресцентна проба која се везује за фосфатидил серин, експримиран на ћелијској мембрани. Пропидијум јодид се везује за DNA присутну у ћелији само уколико је интегритет ћелијске мембране нарушен. У зависности од експресије поменутих маркера, ћелије су дефинисане као: вијабилне (ако су оба маркера остала негативна, $AnnV^-PI^-$), ћелије у раној апоптози ($AnnV^+PI^-$), касној апоптози (оба маркера позитивна, $AnnV^+PI^+$) или у некрози ($AnnV^-PI^+$).

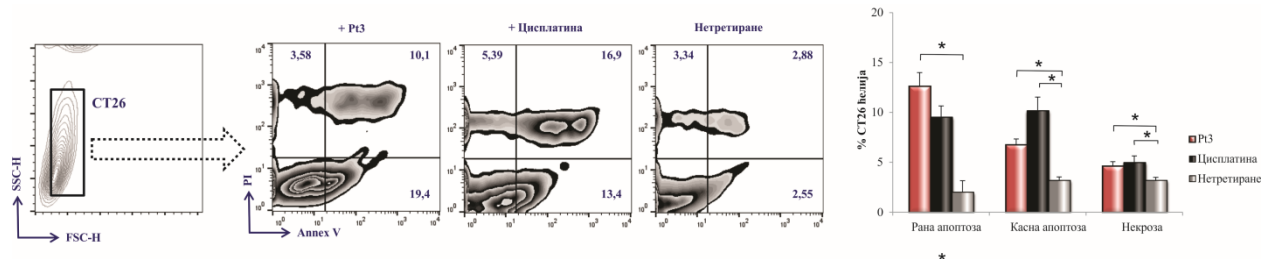
Фигура 11 показује да је највећи проценат 4T1 ћелија третираних новоисинтетисаним Pt3 комплексом, током 24 часа у касној апоптози. Процент ћелија третираних комплексом значајно је виши у односу на нетретиране ћелије, док разлика између ћелија третираних Pt3 комплексом и ћелија третираних цисплатином није досегла статистичку значајност. Процент 4T1 ћелија третираних цисплатином значајно је већи у односу на нетретиране ћелије. Даље, највећи проценат ћелија линије 4T1, третираних цисплатином током 24 часа налази се у раној апоптози. Процент 4T1 ћелија третираних цисплатином значајно је већи и у односу на ћелије третиране Pt3 комплексом, али и у поређењу са нетретираним ћелијама. Процент 4T1 ћелија у некрози, третираних Pt3 комплексом током 24 часа, значајно је већи у односу на нетретиране ћелије. Исти тренд запажен је и у ефекту цисплатине, тако да се на графикону чита значајно већи проценат ћелија у некрози, у односу на нетретиране ћелије. Разлика у проценту 4T1 ћелија третираних Pt3 комплексом и ћелија третираних цисплатином није достигла статистичку значајност.



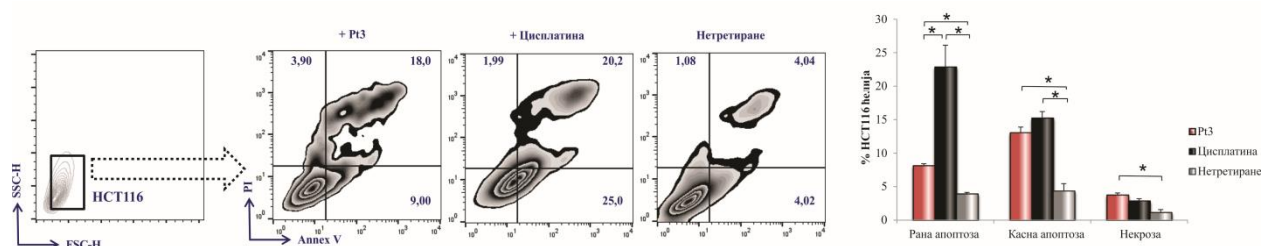
Фигура 11. Pt3 комплекс индукује апоптозу 4T1 туморских ћелија. Апоптоза ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираних ћелија испитивана је методом проточне цитометрије, бојењем анексином V (Ann V) и пропидијум јодидом (PI). Репрезентативни FACS плотови, доњим левим квадрантом, представљају проценат живих ћелија, доњим десним квадрантом, проценат ћелија у фази ране апоптозе, горњим десним квадрантом ћелије у фази касне апоптозе и горњим левим квадрантом, проценат ћелија у некрози, за 4T1 ћелијску популацију нетретираних ћелија, третираних Pt3 комплексом и цисплатином. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

Највећи проценат СТ26 ћелија (Фигура 12) третираних Pt3 комплексом налази се у раној апоптози. Процент ћелија третираних Pt3 комплексом је значајно већи у односу на нетретиране ћелије, док у поређењу са процентом ћелија третираних цисплатином нема статистичке значајности. Након третмана цисплатином, највећи проценат ћелија линије СТ26 је у касној апоптози. Процент СТ26 ћелија третираних цисплатином значајно је већи и у односу на нетретиране ћелије. Такође, постоји статистички значајна разлика у проценту ћелија у касној апоптози, третираних Pt3 комплексом у односу на нетретиране ћелије. Процент ћелија у некрози је највећи у популацији третираној цисплатином. Постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености некротичних ћелија између популација ћелија третираних цисплатином и нетретираних ћелија, као и између ћелија третираних Pt3 комплексом и нетретираних ћелија.

Највећи проценат ћелија линије НСТ116, третираних Pt3 комплексом, током 24 часа био је у касној апоптози (Фигура 13). Постоји статистички значајна разлика између ћелија третираних Pt3 комплексом и нетретираних ћелија у процентуалној заступљености касно апоптотичких ћелија, као и значајна разлика између ћелија третираних цисплатином и нетретираних ћелија. Највећи проценат ћелија третираних цисплатином је у раној апоптози. На графику се уочава статистички значајна разлика у процентуалној заступљености рано апоптотичких ћелија између популација ћелија третираних цисплатином и ћелија третираних Pt3 комплексом. Исти тренд читава се и између ћелија третираних цисплатином у односу на нетретиране ћелије. Највећи проценат ћелија у некрози забележен је након третмана Pt3 комплексом. Постоји статистички значајна разлика у проценту ћелија у некрози третираних Pt3 комплексом у односу на нетретиране ћелије, док у односу на ћелије излагане цисплатини није достигнута статистичка значајност.



Фигура 12. Pt3 комплекс индукује апоптозу CT26 ћелија. Апоптоза ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираних ћелија испитивана је методом проточне цитометрије, бојењем анексином V (AnnV) и пропидијум јодидом (PI). Репрезентативни FACS плотови, доњим левим квадрантом, представљају проценат живих ћелија, доњим десним квадрантом, проценат ћелија у фази ране апоптозе, горњим десним квадрантом ћелије у фази касне апоптозе и горњим левим квадрантом, проценат ћелија у некрози, за CT26 ћелијску популацију нетретираних ћелија, третираних Pt3 комплексом и цисплатином. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

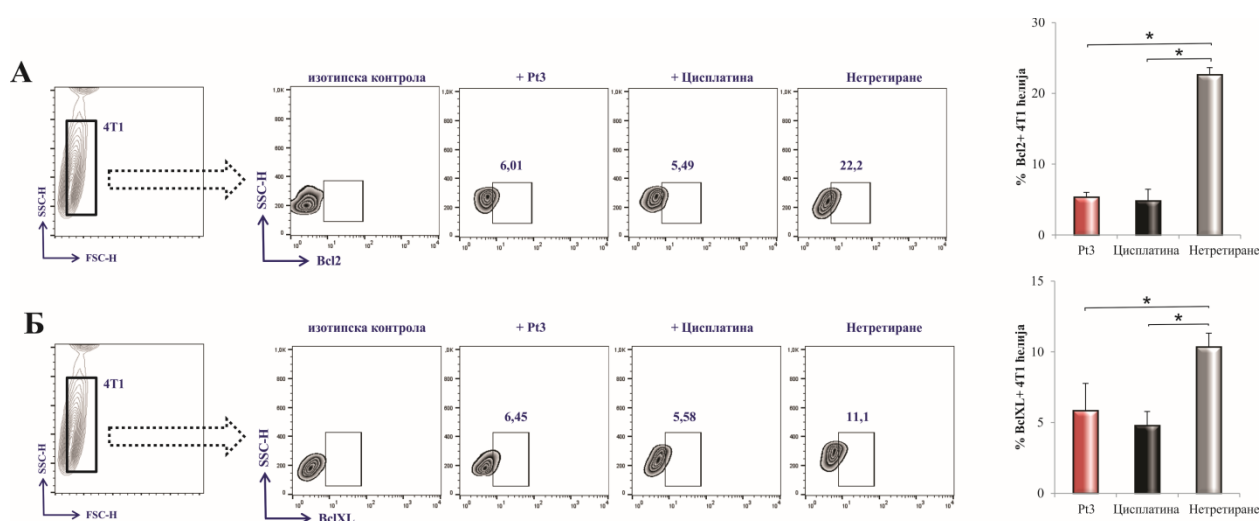


Фигура 13. Pt3 комплекс индукује апоптозу HCT116 ћелија. Апоптоза ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираних ћелија испитивана је методом проточне цитометрије, бојењем анексином V (Ann V) и пропидијум јодидом (PI). Репрезентативни FACS плотови представљају, доњим левим квадрантом, представљају проценат живих ћелија, доњим десним квадрантом, проценат ћелија у фази ране апоптозе, горњим десним квадрантом ћелије у фази касне апоптозе и горњим левим квадрантом, проценат ћелија у некрози, за HCT116 ћелијску популацију нетретираних ћелија, третираних Pt3 комплексом и цисплатином. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

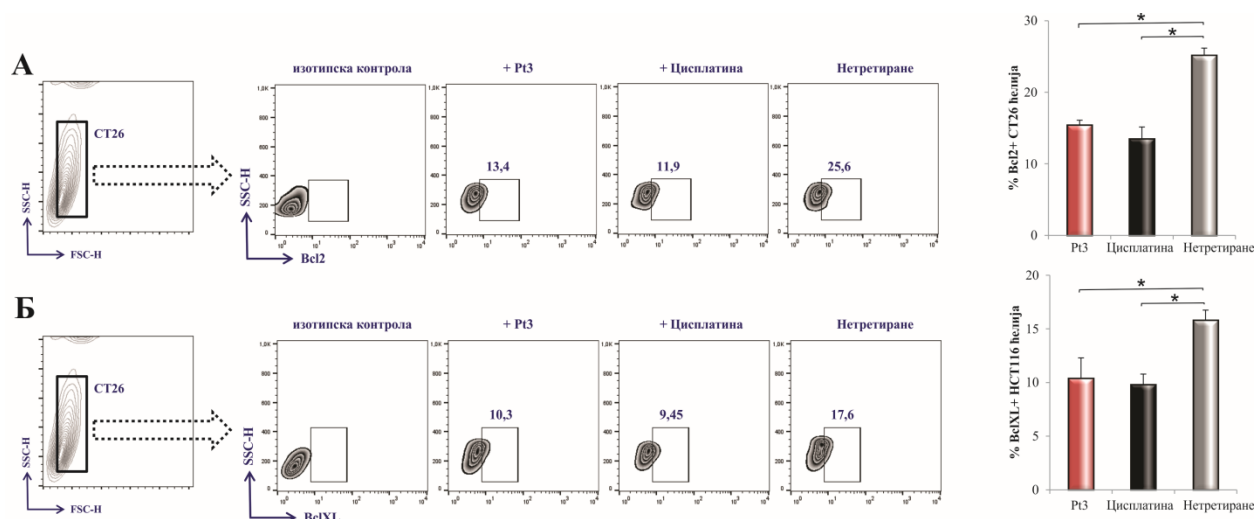
Претходни резултати су показали да новосинтетисани Pt3 комплекс, након излагања током 24 часа, смањује вијабилност и стимулише апоптозу туморских ћелија свих испитиваних линија, одлучили смо да наредним експериментима испитамо експресију антиапоптотских протеина BclXL и Bcl-2 као и експресију каспазе 3. Након третмана ћелија Pt3 комплексом, проценат ћелија свих испитиваних линија, које експримирају BclXL, односно Bcl-2 се значајно смањило у односу на ћелије третиране цисплатином и нетретиране ћелије. Исти тренд је показан и деловањем цисплатине на туморске ћелије линија 4T1, CT26 и HCT116. Процент туморских ћелија испитиваних линија 4T1 и HCT116, третираних Pt3 комплексом или цисплатином, које експримирају каспазу 3 (4T1 и HCT116) био је значајно виши у поређењу са нетретираним ћелијама. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију антиапоптотских протеина BclXL и Bcl-2 у популацијама испитиваних ћелијских линија након 24 часовног излагања Pt3 комплексу или цисплатини.

Процент 4Т1 ћелија које експримирају BclXL и Bcl-2 је највећи у контролној групи. Постоји статистички значајно смањење експресије оба анализирана антиапоптотска протеина у 4Т1 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином у односу на нетретиране ћелије. Процент ћелија које експримирају BclXL и Bcl-2 је сличан у групама третираним Pt3 комплексом и цисплатином, без статистичке разлике у експресији (Фигура 14).

Највећи процент СТ26 ћелија које експримирају BclXL и Bcl-2 регистрован је у нетретираним СТ26 ћелијама. Постоји статистички значајно смањење експресије оба анализирана антиапоптотска протеина у СТ26 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином у односу на нетретиране ћелије. Процент ћелија које експримирају BclXL и Bcl-2 је сличан у групама третираним Pt3 комплексом и цисплатином, без статистичке разлике у експресији (Фигура 15).



Фигура 14. Експресија молекула Bcl-2 (А) и BclXL (Б) у 4Т1 ћелијама, анализирана методом проточне цитометрије. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију антиапоптотских протеина Bcl-2 и BclXL у популацији 4Т1 ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином или нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

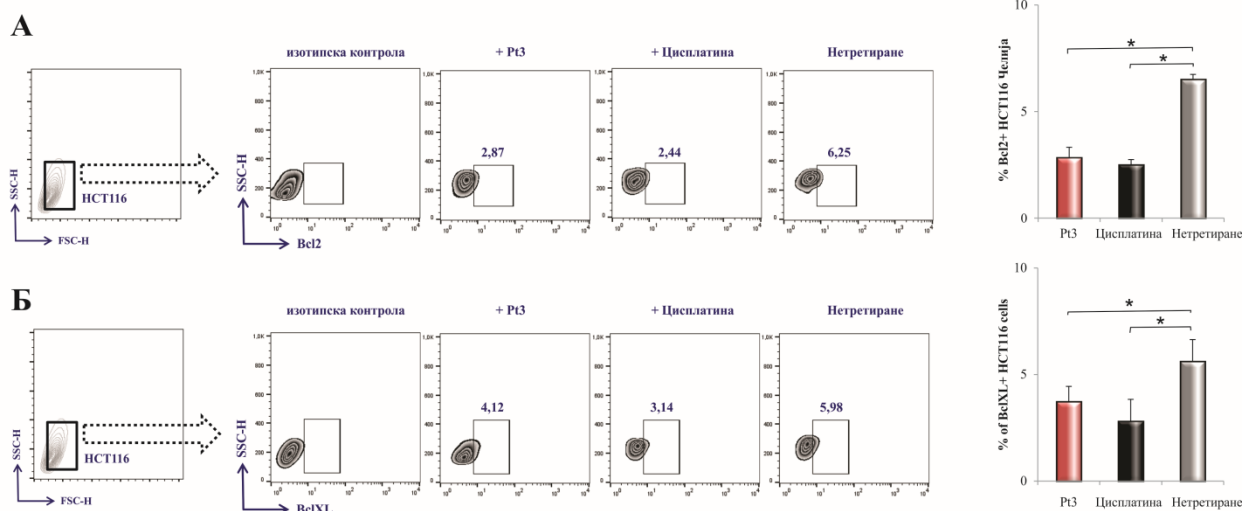


Фигура 15. Експресија молекула Bcl-2 (**А**) и BclXL (**Б**) у СТ26 ћелијама, анализирана методом проточне цитометрије. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију антиапоптотских протеина Bcl-2 и BclXL у популацији ћелија третираних Pt3 комплексом, цицлатином или нетретираним ћелијама ћелијске линије СТ26 након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

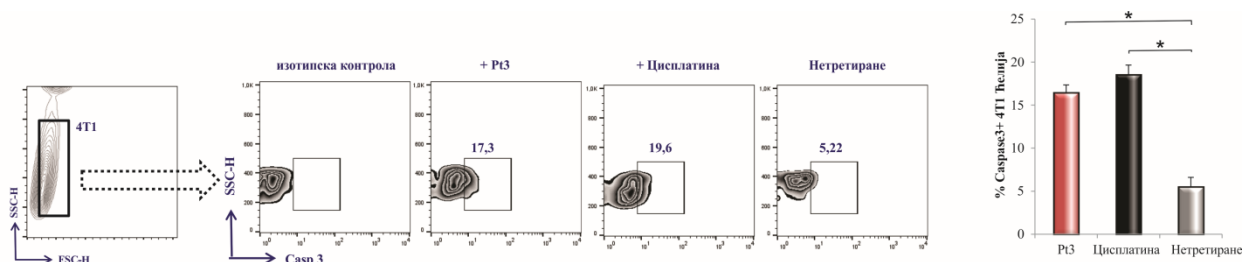
Исти тренд у експресији BclXL и Bcl-2 забележен је у ћелијама линије НСТ116. Постоји статистички значајно смањење експресије оба анализирана антиапоптотска протеина у НСТ116 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цицлатином у односу на нетретирание ћелије. Процент ћелија које експримирају BclXL и Bcl-2 је сличан у групама третираним Pt3 комплексом и цицлатином, без статистичке разлике у експресији (Фигура 16).

Даљом анализом је обухваћена експресија каспазе-3. Резултати анализе проточном цитометријом приказују експресију каспазе-3 у популацијама испитиваних ћелијских линија након 24 часовног излагања Pt3 комплексу и цицлатини, односно у нетретираним ћелијама.

Постоји статистички значајно повећање експресије каспазе -3 у 4Т1 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цицлатином у односу на нетретирание ћелије. Процент ћелија које експримирају каспазу не разликује се значајно између ћелија третираних Pt3 комплексом и цицлатином (Фигура 17).



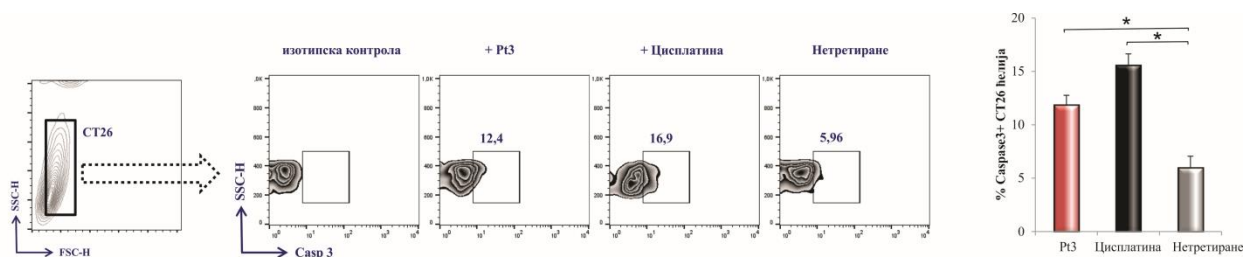
Фигура 16. Експресија молекула Bcl-2 (А) и BclXL (Б) у НСТ116 ћелијама, анализирана методом проточне цитометрије. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију антиапоптотских протеина Bcl-2 и BclXL у популацији ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином или нетретираним ћелијама ћелијске линије НСТ116 након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.



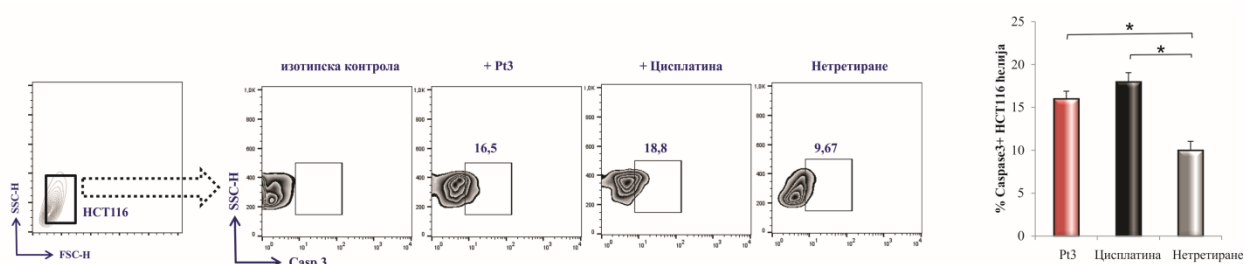
Фигура 17. 4T1 ћелије третиране Pt3 комплексом/цисплатином појачано експримирају каспазу-3. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију каспазе-3 у 4T1 ћелијама третираним Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

У СТ26 ћелијској популацији, такође, највећи проценат ћелија које експримирају каспазу-3, био је у групи мишева третираних цисплатином. Постоји статистички значајно повећање експресије каспазе-3 у СТ26 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином у односу на нетретиране ћелије. Процент ћелија које експримирају каспазу не разликује се значајно између ћелија третираних Pt3 комплексом и цисплатином (Фигура 18).

Процент НСТ116 ћелија које експримирају каспазу-3, највећи је у групи мишева третираним цисплатином. Постоји статистички значајно повећање експресије каспазе 3 у НСТ116 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином у односу на нетретиране ћелије. Процент ћелија које експримирају каспазу не разликује се значајно између ћелија третираних Pt3 комплексом и цисплатином (Фигура 19).



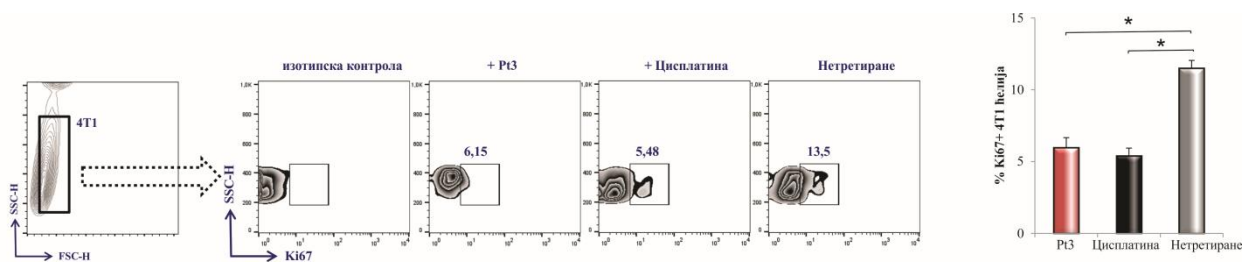
Фигура 18. СТ26 ћелије третиране Pt3 комплексом/цисплатином појачано експримирају каспазу-3. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију каспазе-3 у СТ26 ћелијама третираним Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.



Фигура 19. HCT116 ћелије третиране Pt3 комплексом/цисплатином појачано експримирају каспазу-3. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију каспазе-3 у HCT116 ћелијама третираним Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

4.7 Новосинтетисани Pt3 комплекс показује антипролиферативни потенцијал

Антипролиферативни потенцијал новосинтетисаног комплекса платине, анализирали смо кроз експресију Ki-67, маркера пролиферације у туморским ћелијама 4T1, СТ26 и HCT116, третираним Pt3 комплексом или цисплатином. Као контролу користили смо туморске ћелије гајене само у медијуму (нетретиране ћелије). Резултати анализе проточне цитометрије показују експресију Ki-67 у популацији ћелијских линија 4T1, СТ26 и HCT116, третираним Pt3 комплексом и цисплатином током 24 часа, указујући на разлику између третираних и нетретираних ћелија. Експресија Ki-67 се статистички значајно смањује након третмана 4T1 ћелија Pt3 комплексом, односно цисплатином, у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 20). Није нађена разлика у експресији Ki-67 између ћелија третираних Pt3 комплексом, односно цисплатином.



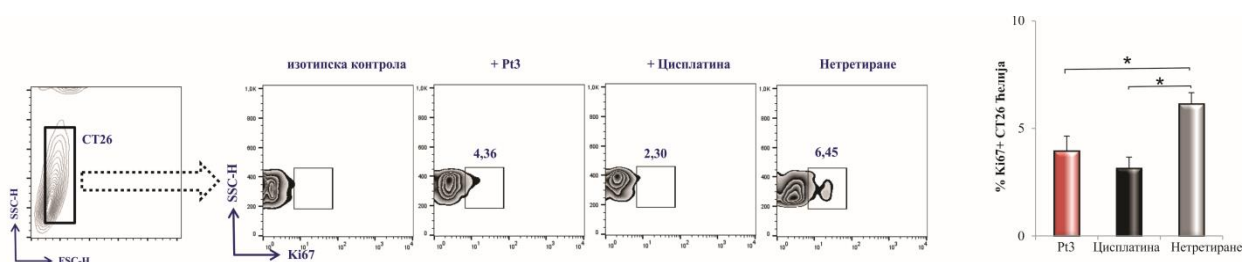
Фигура 20. Смањење експресије Ki-67 у 4Т1 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију Ki-67 у 4Т1 ћелијама третираним Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

Експресија Ki-67 се статистички значајно смањује након третмана СТ26 ћелија Pt3 комплексом, односно цисплатином, у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 21). Није нађена разлика у експресији Ki-67 између ћелија третираних Pt3 комплексом, односно цисплатином.

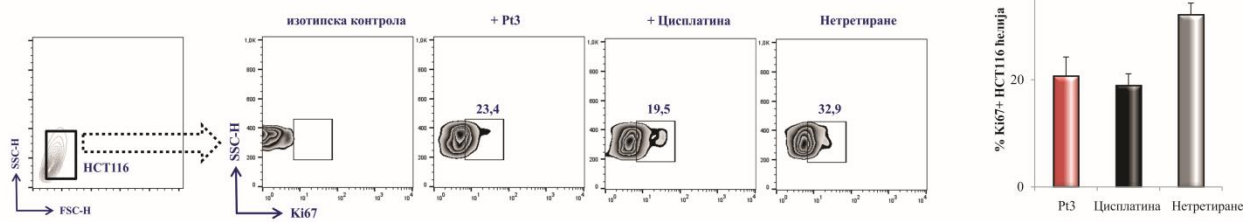
Експресија Ki-67 се статистички значајно смањује након третмана НСТ116 ћелија Pt3 комплексом, односно цисплатином, у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 22). Није нађена разлика у експресији Ki-67 између ћелија третираних Pt3 комплексом, односно цисплатином.

Ефекат Pt3 комплекса, односно цисплатине на способност миграције туморских ћелија анализирана је *scratch* тестом.

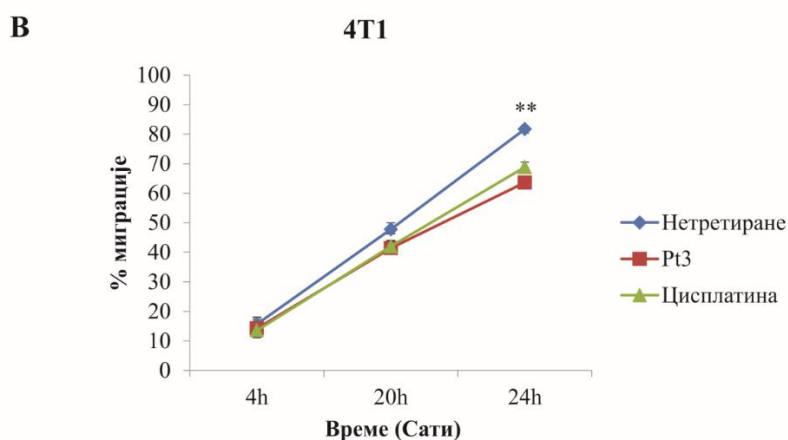
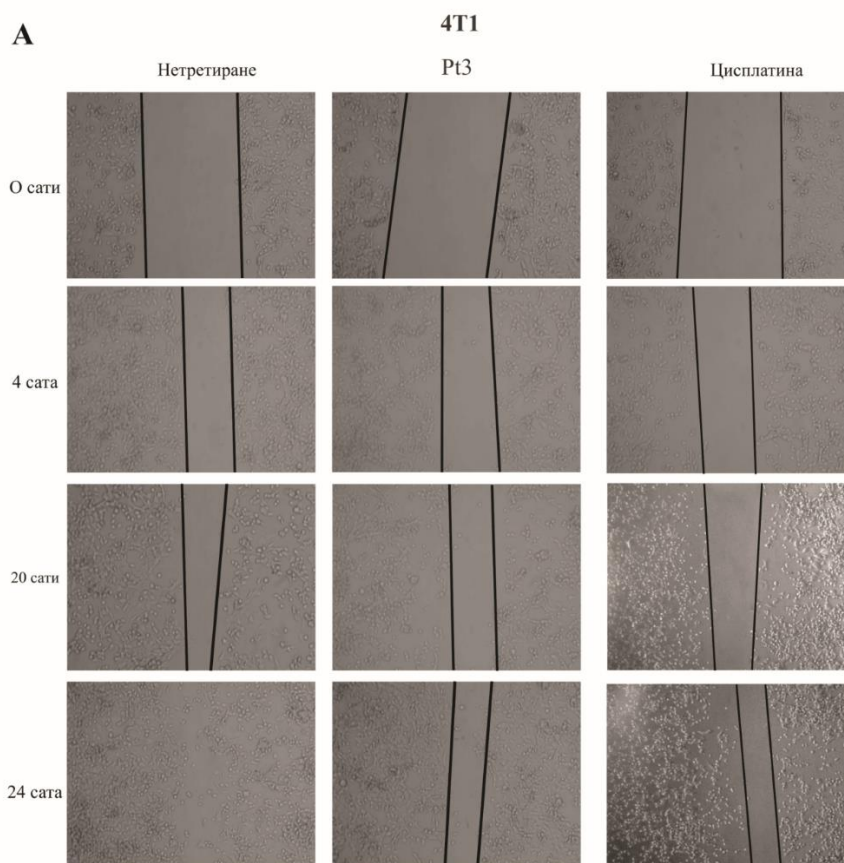
Након администрације Pt3 комплекса, односно цисплатине значајно се смањује миграторна способност 4Т1 туморских ћелија (Фигура 23). Квантификација брзине затварања дефекта, анализирана је коришћењем *Image J* софтвера. Затварање дефекта било је значајно спорије унутар 24 часа након третмана Pt3 комплексом у поређењу са нетретираним ћелијама. Сличан ефекат имала је и цисплатина, унутар 24сата.



Фигура 21. Смањење експресије Ki-67 у СТ26 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију Ki-67 у СТ26 ћелијама третираним Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.



Фигура 22. Смањење експресије Ки-67 у НСТ116 ћелијама третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином. Репрезентативни *dot-plot*-ови приказују експресију Ки-67 у НСТ116 ћелијама третираним Pt3 комплексом, цисплатином и нетретираним ћелијама, након 24 часа. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.



Фигура 23. Ефекат Pt3 комплекса на миграцију 4T1 туморских ћелија одређиван је помоћу *scratch* теста. Затварање дефекта и квантификација поља миграције у популацији 4T1 ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином или нетретираних ћелија праћени су након 4, 20 и 24 часа. Миграција и инвазија ћелија анализирана је у више од 5 микроскопских поља. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$, ** $< 0,001$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

Након администрације Pt3 комплекса, односно цисплатине значајно се смањује миграторна способност СТ26 туморских ћелија (Фигура 24). Затварање дефекта било је значајно спорије унутар 24 часа након третмана Pt3 комплексом у поређењу са нетретираним ћелијама. Сличан ефекат имала је и цисплатина, унутар 24сата.

Исти феномен забележен је и на НСТ116 ћелијама. Након администрације Pt3 комплекса, односно цисплатине значајно се смањује миграторна способност НСТ116 ћелијама туморских ћелија (Фигура 25).

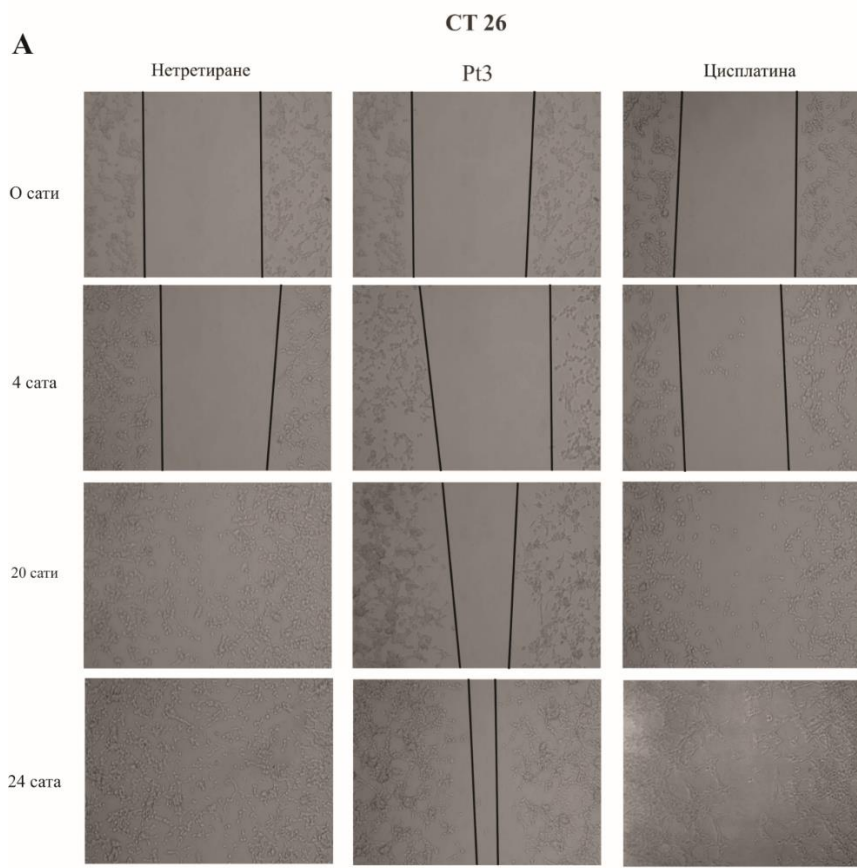
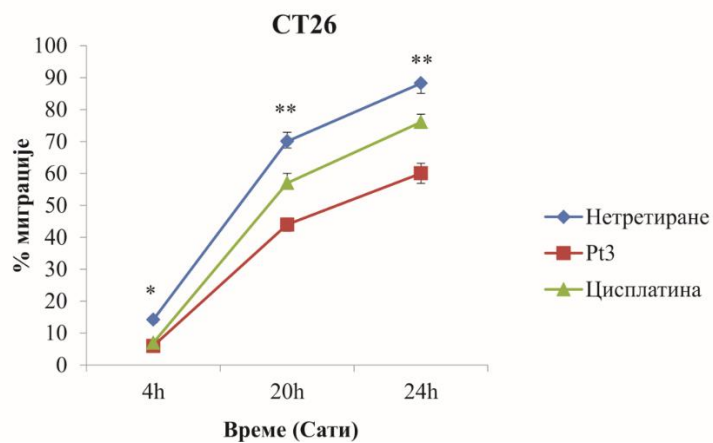
4.8 Испитивање ефеката новосинтетисаног комплекса *in vivo* у ортотопском моделу карцинома дојке миша

Обзиром да се новосинтетисани комплекс платине показао као добар цитотоксички агенс, који је значано смањено пролиферативни потенцијал ћелија мишијег карцинома дојке у *in vitro* условима, уследило је истраживање на *in vivo* моделу мишијег карцинома дојке. Коришћен је ортотопски модел карцинома дојке индукован субкутаном апликацијом 5×10^3 4Т1 ћелија директно у 4. млечну жлезду BALB/c миша. Експериментима је показано да апликација комплекса не утиче статистички значајно на дан појаве тумора, те смо се у наставку истраживања фокусирали на испитивање утицаја на динамику раста примарног тумора. Мишеви су почев од дванаестог дана експеримента, што је одговарало времену палпације туморске масе у дојци, интраперитонеално били третирани новоисинтетисаним Pt3 комплексом у дози од 10 mg/kg телесне масе, или цисплатином у дози од 6 mg/kg телесне масе. Током експеримента коришћена је и група контролних животиња, које су примале физиолошки раствор интраперитонеално по истом моделу, у пет појединачних доза, на трећи дан.

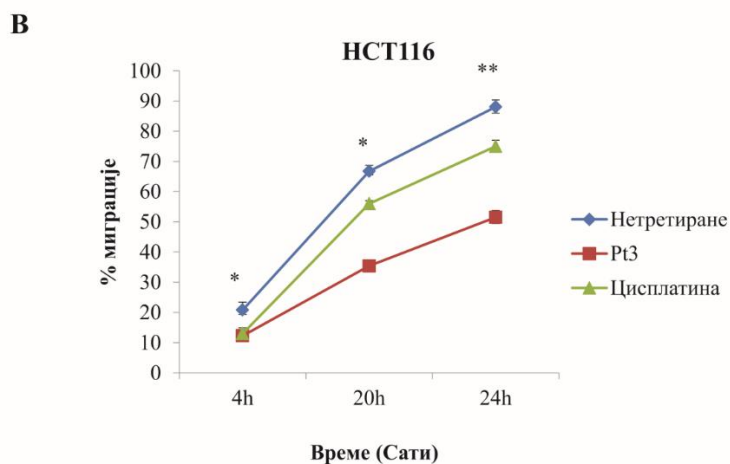
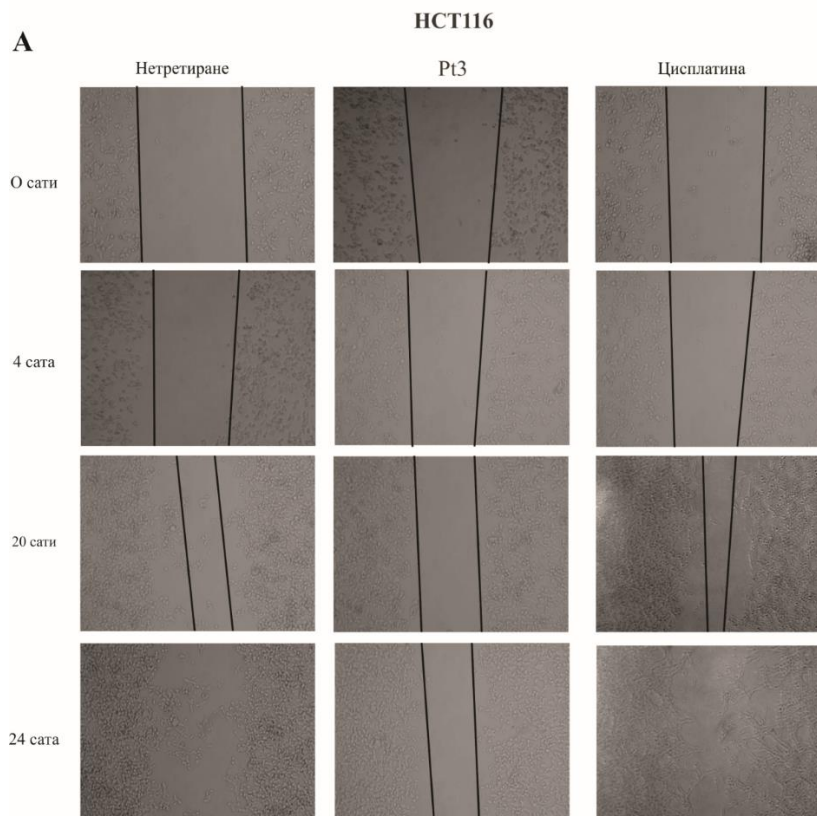
4.9 Новоиспитивани комплекс успорава раст тумора дојке

Раст тумора дојке и мерење дијаметра тумора је свакодневно праћен коришћењем калипера, нониуса. Администрација новосинтетисаног комплекса Pt3, односно цисплатине, значајно је смањила раст примарног тумора дојке, у поређењу са растом тумора нетретираних животиња (Фигура 26А). Тридесетог дана експеримента, третман комплексом Pt3, односно цисплатином статистички значајно је смањено дијаметар тумора третираних мишева у поређењу са дијаметром тумора нетретираних мишева. Овај тренд одржао се до краја експеримента- 36. дана од индукције тумора (Фигура 26А).

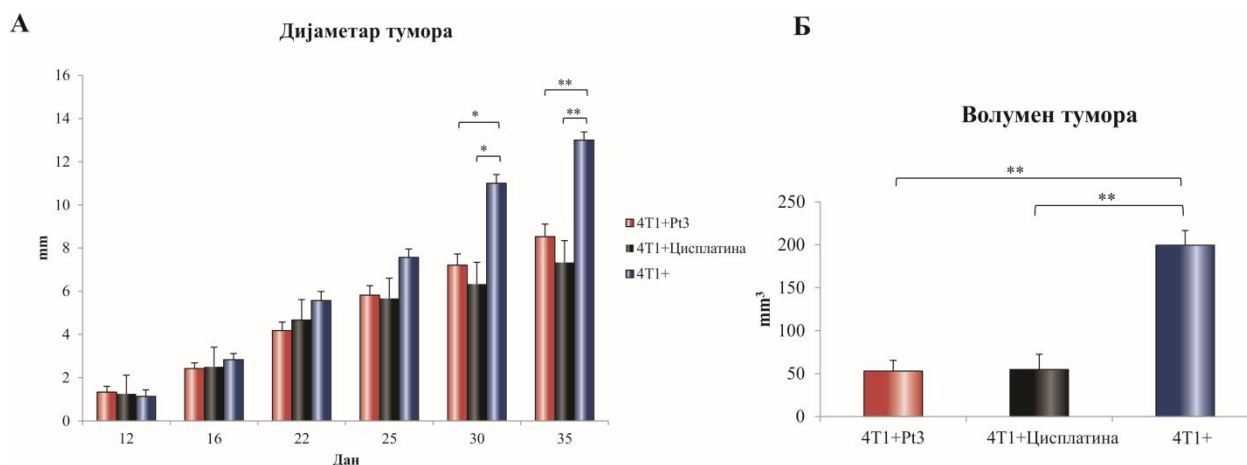
На Фигури 26Б, запремина тумора дојке у групи мишева који су третирани новоиспитиваним комплексом платине је мања, у поређењу са запремином тумора у нетретираним мишева. Разлика у волумену тумора је статистички значајна између група нетретираних мишева и третираних комплексом Pt3, као и између нетретираних мишева и третираних цисплатином (Фигура 26Б).

**B**

Фигура 24. Ефекат Pt3 комплекса на миграцију СТ26 туморских ћелија одређиван је помоћу *scratch* теста. Затварање дефекта и квантификација поља миграције у популацији СТ26 ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином или нетретираних ћелија праћени су након 4, 20 и 24 часа. Миграција и инвазија ћелија анализирана је у више од 5 микроскопских поља. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$, ** $< 0,001$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.



Фигура 25. Ефекат Pt3 комплекса на миграцију НСТ116 туморских ћелија одређиван је помоћу *scratch* теста. Затварање дефекта и квантификација поља миграције у популацији НСТ116 ћелија третираних Pt3 комплексом, цисплатином или нетретираних ћелија праћени су након 4, 20 и 24 часа. Миграција и инвазија ћелија анализирана је у више од 5 микроскопских поља. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка из три независна експеримента. * $p < 0,05$, ** $< 0,001$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.



Фигура 26. Администрација Pt3 комплекса успорава раст примарног тумора дојке. **А:** Дијаметар тумора мишева третираних Pt3 комплексом, Цисплатином и нетретираних мишева (по групи 7-8 мишева). **Б:** Волумен тумора мишева третираних Pt3 комплексом, Цисплатином и нетретираних мишева, изолованих након жртвовања животиња, 36.-ог дана експеримента. Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка. * $p < 0,05$, ** $< 0,001$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

4.10 *In vivo* испитивање токсичности новосинтетисаног Pt3 комплекса

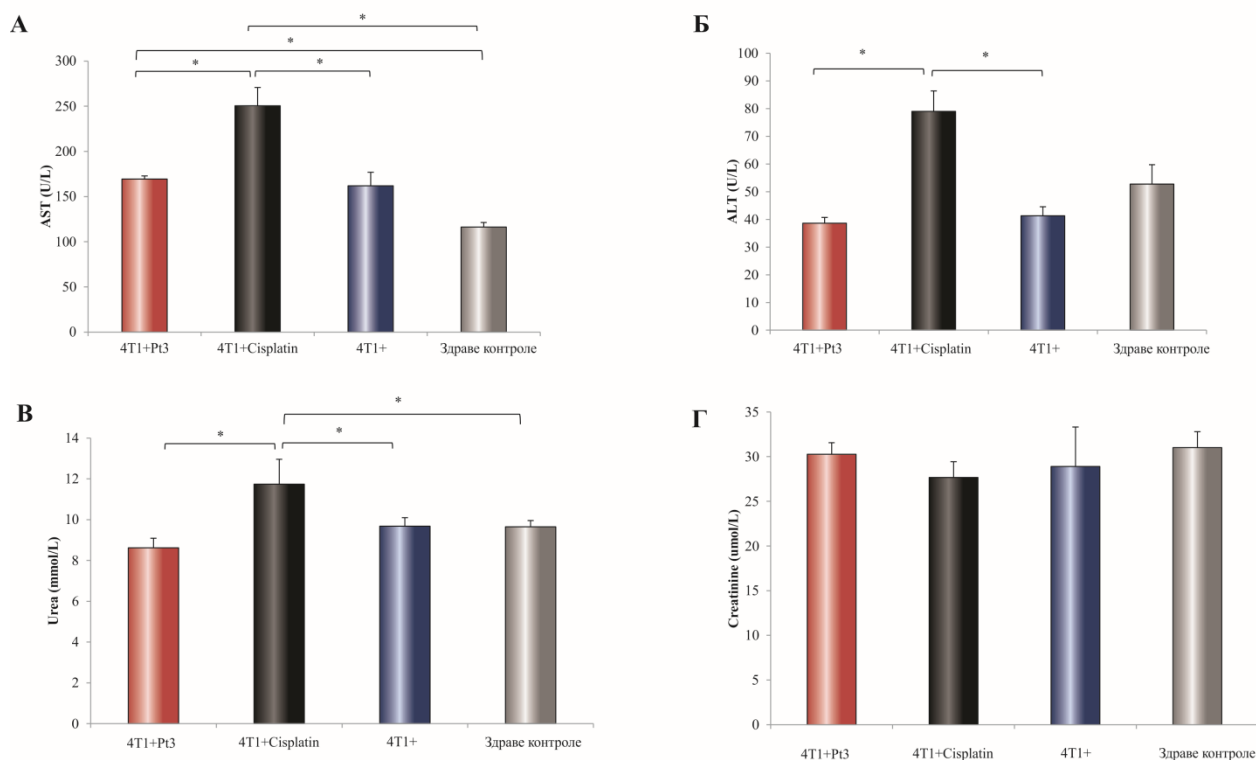
Следећа серија експеримената имала је за циљ испитивање потенцијалног токсичног ефекта новосинтетисаног комплекса платине и упоређивање са већ познатим токсичним ефектима цисплатине. Сви мишеви преживели су до краја експеримента, без знакова тешке форме генерализоване токсичности. Из серума мишева, 36. дана студије, мерени су биохемијски параметри (ALT, AST, уреа и креатинин), а изолацијом органа, праћене су патохистолошке промене у јетри, бубрезима, срцу и плућима.

Највише вредности AST-а измерене су у групи мишева који су примали цисплатину. Вредности AST-а у групи мишева којима је апликован Pt3 комплекс су значајно ниже у односу на групу која је примала цисплатину и на нивоу су групе нетретираних мишева. Вредности AST-а су најниже у здравим мишевима (Фигура 27А).

Највише вредности ALT-а измерене су у групи мишева који су примали цисплатину. Вредности ALT-а у групи мишева којима је апликован Pt3 комплекс су значајно ниже у односу на групу која је примала цисплатину и на нивоу су група нетретираних и здравих мишева (Фигура 27Б).

Највише вредности урее измерене су у групи мишева који су примали цисплатину. Вредности урее у групи мишева којима је апликован Pt3 комплекс су значајно ниже у односу на групу која је примала цисплатину и на нивоу су група нетретираних и здравих мишева (Фигура 27В).

Вредности кеартинина биле су сличне у свим испитиваним групама, без статистички значајне разлике између истих (Фигура 27Г).



Фигура 27. Евалуација токсичне активности Pt3 комплекса. **А:** вредности AST; **Б:** вредности ALT; **В:** вредности уреје; **Г:** вредности креатинина мишева третираних Pt3 комплексом, Цисплатином и нетретираних мишева 36 дана након индукције тумора као и здравих мишева (по групи 7-8 мишева). Подаци су приказани као средње вредности и +/- стандардна грешка. * $p < 0,05$, ** $< 0,001$ указује на статистички значајну разлику између група.

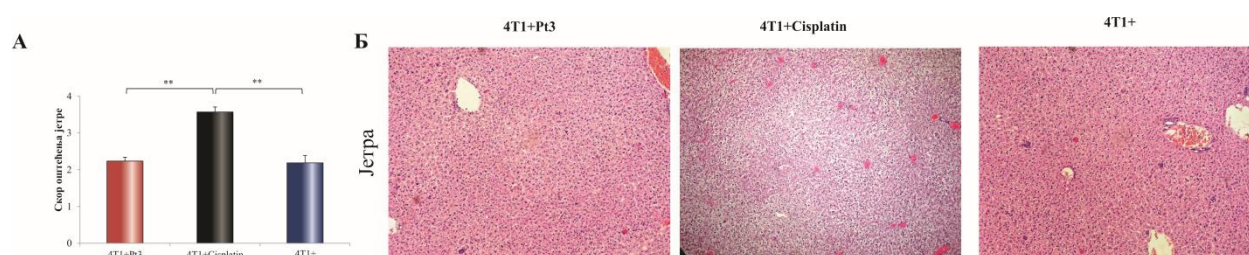
Патохистолошком анализом су тестирани налази добијени биохемијским анализама. Хематоксилином и еозином обојених серијских пресека одговарајућих органа, није показана разлика у оштећењу јетре, бубрега, срца и плућа између мишева третираних комплексом и нетретираних мишева. Слично томе, није било статистички значајне разлике ни у патохистолошком скору испитиваних органа мишева између група третираних Pt3 комплексом и нетретираних мишева. Супротно испитиваном комплексу, третман цисплатином узроковао је токсично оштећење анализираних органа, односно статистички значајно већи скор оштећења јетре, бубрега, срца и плућа у односу на групу мишева третираних Pt3 комплексом и нетретираних мишева. Даље је дефинисан хистолошки скор. На следећим фигурама је показано да је хистолошки скор у јетри, бубрезима, плућима и срцу, највећи у групи мишева третираних цисплатином.

Патохистолошки скор јетре квантификован је на основу перипорталног или перисепталног хепатитиса, конфлуентне некрозе, фокалне литичке некрозе и инфламације и порталне инфламације. Скор оштећења бубрега дефинисан је на основу промена на гломерулима и интерстицијуму. Пратили смо: сегментну атрофију гломерула, перигломеруларну инфилтрацију мононуклеарним леукоцитима, хиперцелуларност гломерула, акумулацију мезангиског матрикса, хипертрофију паријеталних епителних ћелија, перигломеруларну фиброзу и гломерулосклерозу. У интерстицијуму смо пратили присуство фокалне тубуларне базофилије, инфилтрацију мононуклеарима, акутну некрозу епитела тубула, губитак тубула, атрофију и дилатацију тубула са накупљањем протеина у лумену и фиброзу интерстицијума.

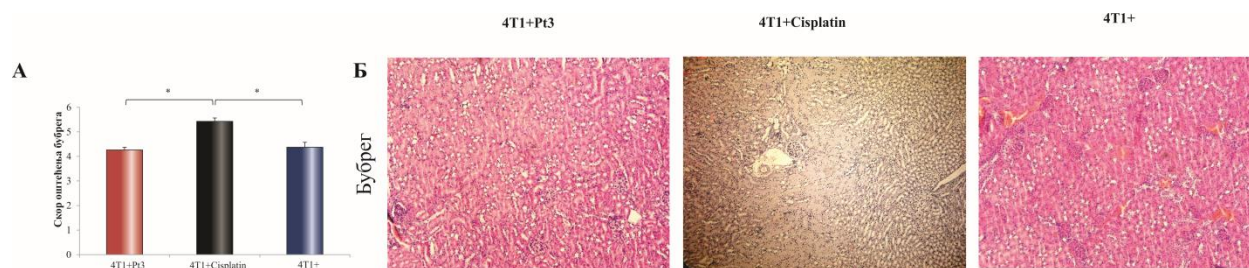
Патохистолошки скор оштећења плућа заснивао се на процени: фиброзе, поља пнеумонитиса, хиперплазије или хипертрофије пнеумоцита, задебљања алвеоларних преграда, поља ателектазе, компензаторног емфизема и алвеолитиса. Скоровање кардиотоксичности оцењивано је на основу вакуолизације кардиомиоцита, инфилтрације мононуклеарним ћелијама и интерстицијалне фиброзе са дезорганизацијом или атрофијом миофибрила. Већина анализираних параметара, била је подељена у четири подскора и то: **скор 0** = без патолошких промена; **скор 1** = патолошке промене у мање од 10% препарата; **скор 2** = патолошке промене у 10 до 50% препарата; **скор 3** = патолошке промене у више од 50 % препарата. За поједине анализираних параметре оштећења јетре, коришћени су подскорови **скор 4** = дифузне патолошке промене **скор 5** и **скор 6**, као што је приказано у табелама 1-4.

Промене у јетри мишева у групи третираној Pt3 комплексом подразумевале су: микровезикуларну стеатозу јетре, фокално некрозу периферне зоне јетриних лобулуса и хиперплазију Купферових ћелија. Исте промене и поља потралне инфламације, са накупљањем неутрофила унутар и око крвних судова, виђене су у јетри нетретираних мишева са карциномом дојке, која није примала ни Pt3 комплекс, ни цисплатину. Третман цисплатином узроковао је дифузно, балонирајућу дегенерацију и широка поља некрозе хепатоцита (Фигура 28).

Промене у бубрезима мишева третираних Pt3 комплексом подразумевале су: хиперцелуларност гломерула, поља интерстицијалног нефритиса, паренхиматозну дегенерацију епитела тубула и фокално некрозу епитела тубула, слично променама виђеним у бубрезима нетретираних мишева са карциномом дојке. У групи мишева третираних цисплатином виђена су опсежна поља вакуолизације епитела проксималних тубула, дилатација тубула и некроза тубуларног епитела, местимично са хијалиним цилиндрима у лумену (Фигура 29).



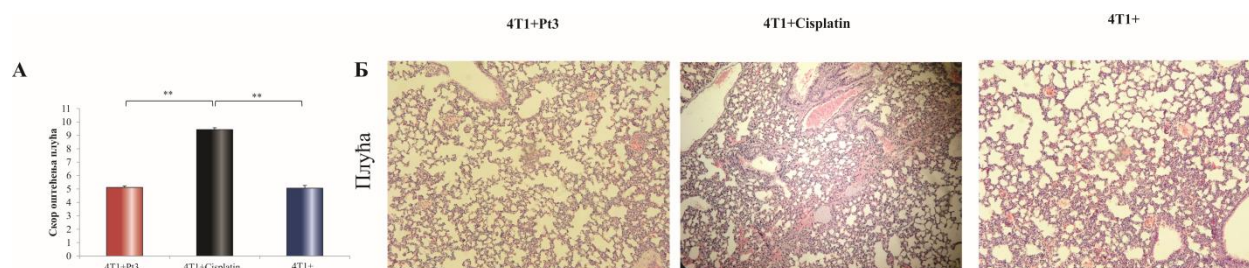
Фигура 28. Патохистолошка процена оштећења јетре. **А:** Укупан патохистолошки скор оштећења јетре; **Б:** Репрезентативни фотомикрографи оштећења јетре, обојени стандардним хематоксилин-еозин бојењем, под увеличањем 40х. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна грешка и коришћено је 10 животиња по групи. Статистичка значајност је израчуната помоћу *Mann-Withney*-евог *U* теста.



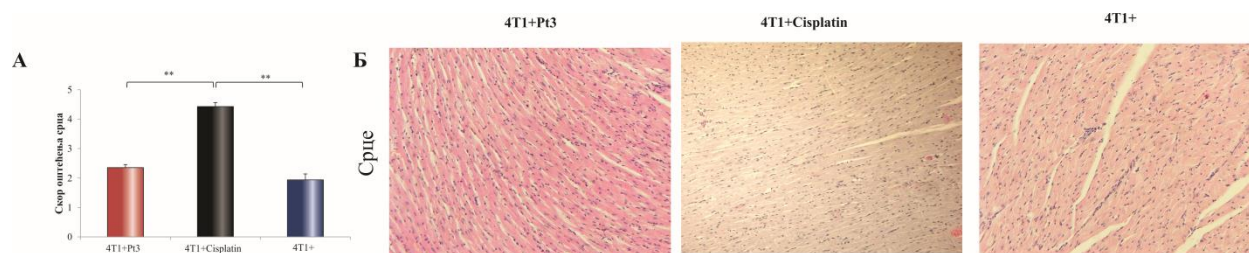
Фигура 29. Патохистолошка процена оштећења бубрега. **А:** Укупан патохистолошки скор оштећења бубрега; **Б:** Репрезентативни фотомикрографи оштећења бубрега, обојени стандардним хематоксилин-еозин бојењем, под увеличањем 40x. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна грешка и коришћено је 10 животиња по групи. Статистичка значајност је израчуната помоћу *Mann-Withney*-евог *U* теста.

На анализираним серијским пресецима плућа, мишева третираних Pt3 комплексом запажено је присуство: поља интерстицијалне пнеумоније, задебљања алвеоларних преграда, алвеолитиса, ретких поља ателектазе и емфизема. Сличне промене виђене су и у групи нетретираних мишева. Третман цисплатином узроковао је хипертрофију пнеумоцита, задебљање алвеоларних преграда са гомилањем везивних влакана, септалну фиброзу, опсежна поља ателектазе и местимично поља емфизема (Фигура 30).

Промене на срцу мишева третираних Pt3 комплексом и нетретираних мишева биле су сличне и подразумевале су присуство местимичних поља вакуолизације кардиомиоцита, инфилтрацију мононуклеарима и атрофију и дезорганизацију миофибрила. Промене на срцу мишева третираних цисплатином биле су дифузна вакуолизација и поља некрозе кардиомиоцита (Фигура 31).



Фигура 30. Патохистолошка процена оштећења плућа. **А:** Укупан патохистолошки скор оштећења плућа; **Б:** Репрезентативни фотомикрографи оштећења плућа, обојени стандардним хематоксилин-еозин бојењем, под увеличањем 40x. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна грешка и коришћено је 10 животиња по групи. Статистичка значајност је израчуната помоћу *Mann-Withney*-евог *U* теста.



Фигура 31. Патолошко-анатомска процена оштећења срца. **А:** Укупан патолошко-анатомски скор оштећења срца; **Б:** Репрезентативни фотомикрографи оштећења срца, обојени стандардним хематоксилин-еозин бојењем, под увеличањем 40х. Подаци су приказани као средње вредности \pm стандардна грешка и коришћено је 10 животиња по групи. Статистичка значајност је израчуната помоћу *Mann-Whitney*-евог *U* теста.

5 ДИСКУСИЈА

У овој студији први пут је испитиван цитотоксички потенцијал новосинтетисаних комплекса Pt(II) са фенантролинским лигандима као и антитуморска активност на ћелијским линијама карцинома дојке миша (4T1), мишјег (СТ26) и хуманог карцинома колоректума (HCT116) и у *in vivo* моделу мишјег карцинома дојке. У овој студији, такође, по први пут је доказана кристална структура анхидрованог комплекса Pt3, одређена дифракцијом рендгенских зрака монокристала.

Малигне болести представљају групу обољења које се карактеришу несврсисходним, аутономним, неконтролисаним, локално деструктивним растом и ширењем измењених туморских ћелија. Могу се појавити у било ком делу тела и водити порекло од било ког ткива (318). Подразумевају промене неправилног облика, назупчаних ивица, нејасано ограничене ка околном здравом ткиву, које метастазирају и обично су лоше прогнозе (1). Заузимају значајно место у патологији, обзиром на стални пораст инциденције у последњих неколико година. Годишње у свету од малигнух болести живот изгуби преко осам милиона људи (319). У свету је преко 14 милиона људи оболело од неке врсте малигнитета, а процењује се да ће се кроз десетак година, број увећати за читавих 50%. Поједини типови малигнитета преодоминантно су везани за пол. Најчешћи типови малигнух болести су: карцином плућа, карцином колоректума, карцином дојке, простате и грлића материце (116). Србија се налази на 4. месту у свету по стопи смртности од малигнух болести (119). Инциденца малигнух болести код оба пола у сталном је порасту. Највећи пораст инциденце и морталитета, код мушке популације у Србији забележен је за карцином плућа (31%), колоректума (13%) и простате (8,4%), док је највећи пораст инциденце и морталитета код женске популације у Србији забележен за карцином дојке (18,3%), плућа (15,4%), колона (11,5%) и цервикса (4,9%) (119, 320). Обзиром на сталан пораст броја оболелих и преминулих од малигнитета у свету, неопходно је пронаћи ефикасније начине за рано дијагностиковање и ефикасно лечење малигнух тумора (321).

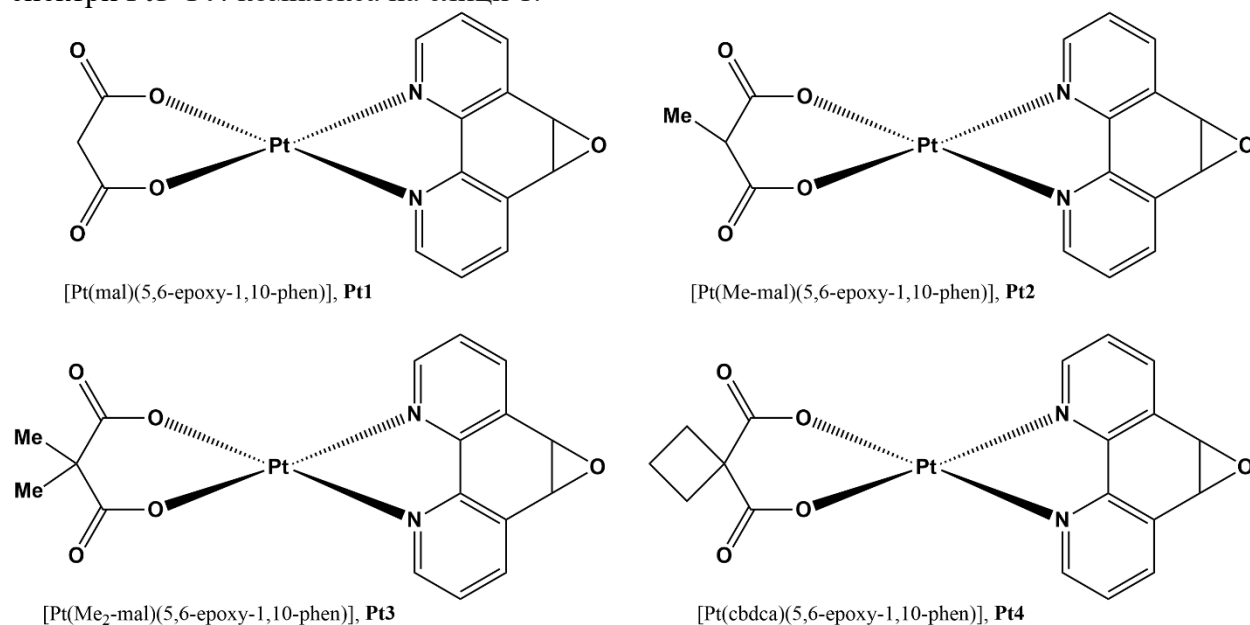
Открићем цисплатине почиње доба примене антитуморских лекова на бази јона метала. Поред доброг антитуморског ефекта примена оваквих агенаса праћена је озбиљним нежељеним дејствима и све већом стопом резистенције (229). У потрази за лековима који имају бољи учинак, а мање нежељених ефеката у односу на цисплатину, синтетисан је велики број аналога платине попут оксиплатине, карбоплатина, хептоплатине, лобаплатине и недаплатине (322). Последњих година се појавила трећа генерација деривата платине, тзв. полинуклеарни комплекси платине (280). За добијање алтернативних комплекса платине данас се користи велики број различитих неорганских и органских лиганата. Један од најчешће коришћених лиганата у савременој координационој хемији је 1,10-фенантролин (phen), класични планарни хелатни лиганд за јоне прелазних метала (293). Круте је структуре, због постојања централног прстена, што му омогућава да положи два доhorsка атома азота буду погодна за координацију и формирање комплекса са јонима метала. Примене комплекса који садрже 1,10-фенантролин су бројне. Двострука веза у 1,10-фенантролину у положају 5,6 је најосетљивија на електрофилни напад, тако да могу да настану деривати епоксида као што је случај у 5,6-дихидро-5,6-епокси-1,10-фенантролину. Присуство епоксидног прстена омогућава брзу реакцију са широким спектром нуклеофила и са високом региоселективношћу (293).

5.1 Синтеза и карактеризација Pt(II) комплекса, Pt1–Pt4

Четири мононуклеарна платина(II) комплекса, Pt1–Pt4, опште формуле [Pt(L)(5,6-ероху-1,10-phen)], где је L ањон малонске киселине (mal, Pt1), 2-метилмалонске киселине (Me-mal, Pt2), 2,2-диметилмалонска киселина (Me₂-mal, Pt3) или 1,1-циклобутандикарбоксилне киселине (CBDCA, Pt4) и 5,6-ероху-1,10-phen је 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин (слика 3), синтетизована су и окарактерисана елементалном микроанализом и различитим спектроскопским техникама. Реакција синтезе ових комплекса приказана је на схеми 1.

5.2 ¹H MR спектроскопија Pt1–Pt4 комплекса

Мононуклеарни платина(II) комплекси, Pt1–Pt4, имају исти 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролински бидентатно координовани лиганд, а различите, такође, бидентатно координоване лиганде L (L = mal, Me-mal, Me₂-mal, CBDCA) - слика 1 из одељка резултати. ¹H и ¹³C NMR спектри слободних лиганата L и 5,6-ероху-1,10-phen, као и Pt1–Pt4 комплекса снимљени су у деутерисаној води (D₂O) и деутерисаном диметил-сулфоксиду (dmsо-d₆) као растварачу. NMR подаци за лиганде и синтетизоване Pt(II) комплексе дати су у табели 11, а одговарајући ¹H и ¹³C NMR спектри Pt1–Pt4 комплекса на слици 1.



Слика 3. Структурне формуле синтетисаних комплекса платине(II) (Pt1–Pt4).

Табела 11. ^1H и ^{13}C NMR хемијска померања (δ , ppm) за 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин (5,6-ероху-1,10-phen), малонску (mal), 2-метилмалонску (Me-mal), 2,2-диметилмалонску (Me₂-mal) 1,1-циклобутандикарбоксилну (CBDCA) киселину, као и одговарајуће комплексе платине(II)

Позиција атома 5,6-ероху-1,10-phen	^1H				
	слободан 5,6-ероху-1,10-phen	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4
H5, H6	4.85 s	5.09 s	5.08 s	5.09 s	5.08 s
H3, H8	7.55 dd	7.98 dd	7.96 dd	7.98 dd	7.97 dd
H4, H7	8.27 dd	8.73 d	8.73 dd	8.79 m	8.78 m
H2, H9	8.81 dd	8.82 dd	8.80 dd		
Mal		1.23 s			
Me-mal	CH ₃ Me-mal		1.08 d		
	CH Me-mal		3.79 d		
Me ₂ -mal	CH ₃			1.55 d	
CBDCA	CH ₂				1.72 m
					2.62 m
Позиција атома 5,6-ероху-1,10-phen	^{13}C				
	слободан 5,6-ероху-1,10-phen	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4
C5, C6	55	55	54	54	54
C3, C8	124	128	128	128	128
C4a, C6a	130	134	133	134	133
C4, C7	139	141	142	141	142
C2, C9		148	147	147	147
C1a, C10a	150	157	152	152	152
COO		175	175	178	175
Mal		45			
Me-mal	CH ₃		14		
	CH		51		
Me ₂ -mal	CH ₃			26	
	C			52	
CBDCA		C3			15
		C2, C4			30
		C1			56

У ароматичном делу ^1H NMR спектра Pt1-Pt4 комплекса (слика 1 и табела 11) могу се уочити три сета сигнала приписаних протонима 5,6-ероху-1,10-phen лиганда координованог за Pt(II) јон (C2H и C9H, C4H и C7H, и C3H и C8H). Сигнали C5H и C6H протона 5,6-ероху-1,10-phen лиганда јављају се као синглети на приближно 5,08 ppm за све испитиване комплексе. У спектру се могу уочити сигнали у опсегу од 1,23-3,79 ppm, који припадају H атомима бидентатно координованих дикарбоксилних киселина. Као што се може видети из табеле 11, сигнали протона ароматичног прстена 5,6-ероху-1,10-phen лиганда у комплексима Pt1-Pt4 су померени ка нижем пољу,

односно на више хемијско померање, у односу на исте за некоординовани 5,6-ероху-1,10-phen лиганд.

5.3 ^{13}C NMR спектроскопија Pt1–Pt4 комплекса

^{13}C NMR спектри Pt1-Pt4 комплекса снимани су у dmsO-d6 као растварачу. Због присуства ароматичних угљеникових атома уочава се шест различитих сигнала чији се положаји приметно разликују од истих у некоординованом 5,6-ероху-1,10-phen лиганду (слика 1 и табела 11. Као последица комплексирања за Pt(II) јон, сигнали свих угљеникових атома у прстену се померају на ниже поље након бидентатне координације 5,6-ероху-1,10-phen лиганда. У ^{13}C NMR спектру Pt1 комплекса може се уочити сигнал на 45 ppm који припада угљениковом атому из CH_2 групе малонског анјона. Спектар комплекса Pt2 садрже два пика, на 14 и 51 ppm, који припадају C атомима из CH_3 и CH група метилмалонске киселине. Диметилмалонска киселина, као бидентатно координовани лиганд за Pt(II) јон, даје два сигнала у ^{13}C NMR спектру комплекса Pt3, на 26 ppm за C атом из CH_3 групе и на 53 ppm за кватернарни C атом. У спектру Pt4 комплекса, C3 атом даје сигнал на 15 ppm, C2 и C4 атоми на 30 ppm, док C1 атом даје сигнал на 56 ppm.

5.4 UV-vis спектрофотометрија Pt1–Pt4 комплекса

UV-Vis спектри Pt1-Pt4 комплекса приказани су на фигури 7. У одељку Резултати наведене су таласне дужине максимума апсорпције за испитиване комплексе (λ_{max} , nm) и коефицијенти моларне екстинкције (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Сви комплекси имају апсорпциону траку која одговара $\pi \rightarrow \pi^*$ електронским прелазима координованог 5,6-ероху-1,10-phen лиганда у опсегу 260-265 nm ($\epsilon = (32,3-22,0) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Апсорпција у опсег 312-327 nm одговара електронским прелазима $n \rightarrow \pi^*$ који указују на пренос наелектрисања лиганд - метал (LMCT).

5.5 IR спектроскопија Pt1–Pt4 комплекса

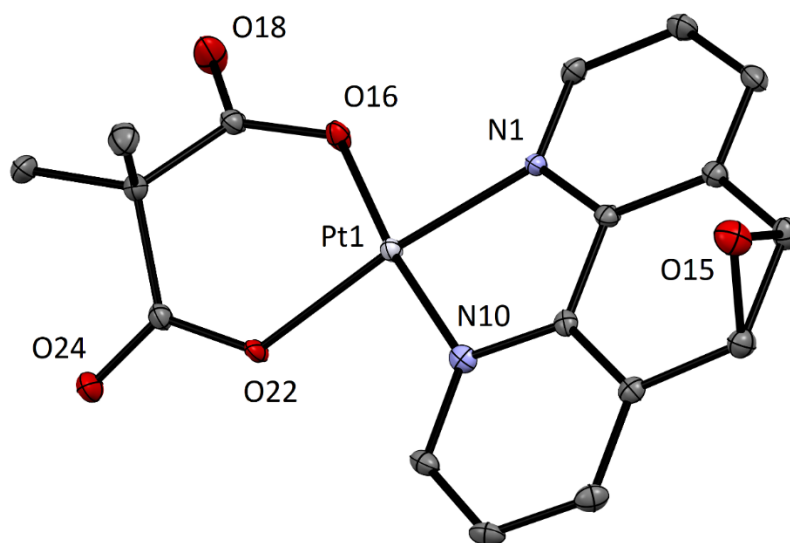
На слици 2 су приказани IR спектри Pt1-Pt4 комплекса снимљени у опсегу 4000 - 450 cm^{-1} који показују траке које одговарају бидентатно координованим L и 5,6-ероху-1,10-phen лигандима.

Траке у опсегу 1610-1667 cm^{-1} у IR спектрима комплекса могу се приписати асиметричним валенционим вибрацијама карбонилне групе ($\nu_{\text{as}}(\text{COO})$) (323). Нажалост, фреквенцију симетричних валенционих вибрација депротоноване карбонилне групе (COO) није могуће утврдити у IR спектрима комплекса због присуства одговарајућих трака ароматичних прстенастенова у овом опсегу таласних дужина. Траке у опсегу 1443-1350 cm^{-1} приписују се фреквенцији вибрација C–C/C–N веза ($\nu(\text{C}=\text{C})$ и $\nu(\text{C}=\text{N})$) у фенантролинском лиганду, док се присуство епоксидног прстена у структури може потврдити јаким тракама на 804 cm^{-1} .

5.6 Рендгенска структурна анализа анхидрованог Pt3 комплекса

Методом прекристализације из хлороформа добијени су монокристали анхидрованог Pt3 комплекса, $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{-met})(5,6\text{-ероху-1,10-phen})]$ који су били погодни за рендгенску

структурну анализу. Резултати рендгенске структурне анализе су показали да кристална структура има очекивану планарну геометрију платина(II) јона са бидентатно координованим лигандима (слика 4). Присутан епоксидни супституент је изазвао благу закривљеност у фенантролинском ароматичном систему са углом између равни дефинисаних крајњим 6-очланим прстеновима у фенантролинском систему, од 13,15°. Са друге стране, дикарбоксилатни лиганд је формирао шесточлани прстен са централним јоном платине(II) у конформацији компресоване лађе. Све дужине веза, упркос деформацији, су биле у оквиру опсега вредности за Pt-N_{phen} и Pt-O_{карбоксилат} везе. Одабране везе и углови веза су приказани у табели 12, а кристалографски подаци за комплекс Pt3 дати су у табели 5 у одељку Резултати.



Слика 4. Кристална структура комплекса Pt3, [Pt(Me₂-met)(5,6-ероxy-1,10-phen)]

Табела 12. Одговарајуће дужине веза (Å) и величине углова веза (°) у [Pt(Me₂-met)(5,6-ероху-1,10-phen)] комплексу

	дужина везе (Å)
Pt1—O16	1.990(2)
Pt1—O22	1.996(2)
Pt1—N1	1.990(2)
Pt1—N10	1.996(2)
	углови (°)
O16—Pt1—O22	91.87(8)
O16—Pt1—N1	92.33(9)
O16—Pt1—N10	173.32(9)
O22—Pt1—N10	93.91(10)
N1—Pt1—O22	173.83(9)
N1—Pt1—N10	81.64(10)

5.7 Стабилност комплекса Pt1-Pt4

Спектрофотометријски праћена стабилност ових комплекса показала је да бидентатно координовани хелатни лиганди са дикарбоксилним анјонима остају координовани за Pt(II) јон током времена извођења експеримената (Фигура 8). То је у складу са резултатима добијеним за карбоплатину и оксалиплатину у којима хелатно координовани анјонски лиганд реакције супституције у води чини много споријим, тако да су водени раствори ових једињења у води стабилни током неколико недеља, па чак и месеци.

5.8 Интеракције динуклеарних комплекса платине(II) са DNA

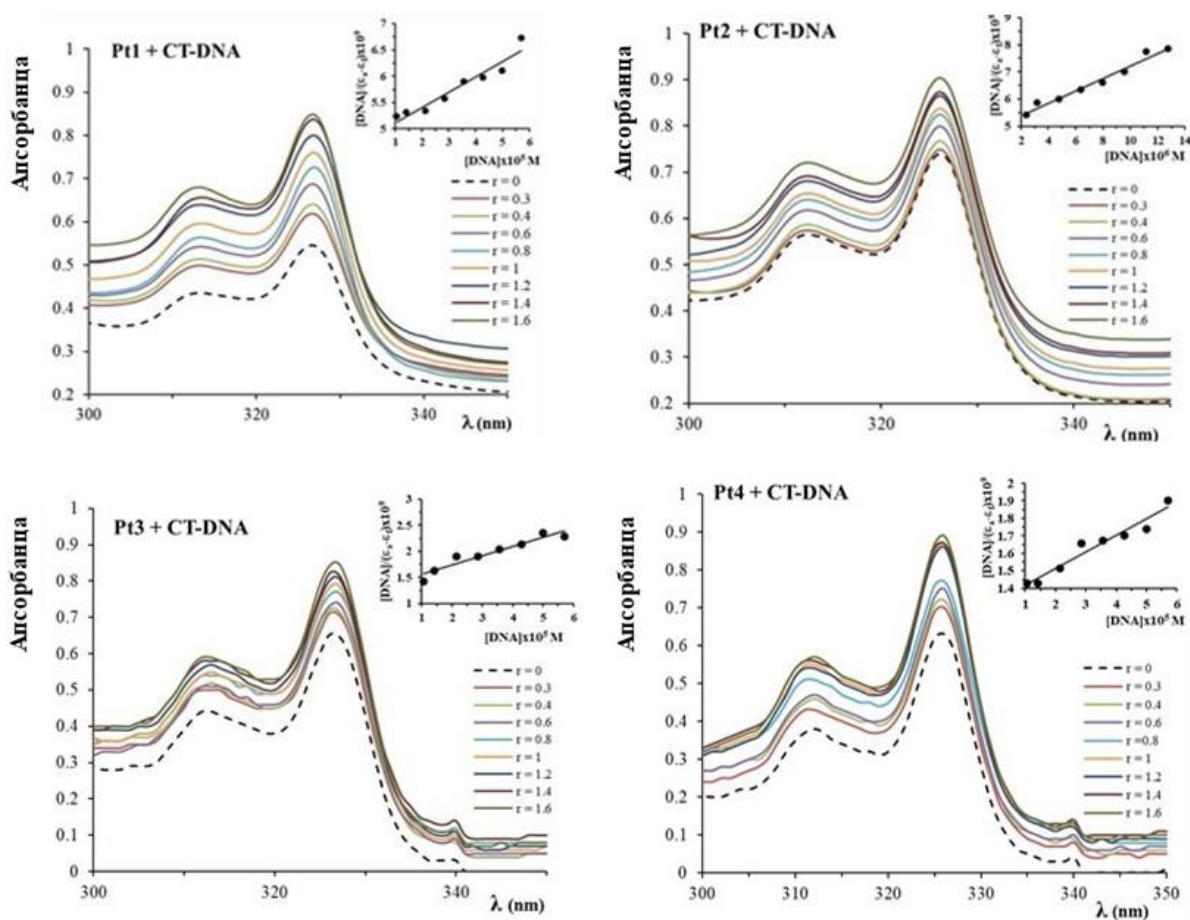
5.8.1 UV-Vis спектрофотометријска мерења

За одређивање начина координације или интеракције комплекса јона метала са молекулима DNA користи се UV-Vis спектрофотометрија. Комплекси јона прелазних метална се могу везати за DNA путем ковалентне или нековалентне интеракције (324). Координацијом молекула DNA, која се најчешће остварује преко Н7 атома гуанина за јон метала настаје ковалентна веза, док нековалентне интеракције могу бити интеркалација, формирање водоничних веза и електростатичке интеракције. Ако је начин везивања интеркалација, услед интеракције комплекса са молекулом DNA, интензитет апсорбанце може да опада (хипохромни ефекат) или да расте (хиперхромни ефекат). Поред промена у интензитету апсорбанце може настати батохромно или хипсохромно померање апсорбционог максимума.

Апсорпциони спектри комплекса Pt1-Pt4 са DNA приказани су на фигури 32. Интензитет апсорпционих трака се постепено смањивао. На основу добијених

результата израчунате су унутрашње константе везивања (стабилности) DNA за јон метала одговарајућег комплекса и приказане су у табели 6. Вредности константе K_b су реда величине 10^4 за све испитиване комплексе Pt(II), што указује да се комплекси везују за CT-DNA, али слабије од класичног интеркалатора као што је EtBr ($K_b = 1,23 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) [33]. Из вредности K_b за сваки комплекс, може се закључити да увођење стерно захтевније дикарбоксилне киселине у координациону сферу Pt(II) јона узрокује слабије интеракције Pt(II) комплекса са CT-DNA. Вредности K_b које су приказане у табели 6 су у сагласности са K_b вредностима објављеним за друге моноклеарне Pt(II) комплексе (325).

Промена *Gibbs*-ове енергије (ΔG) за комплексе Pt1-Pt4 израчуната је применом на основу добијених вредности K_b (Табела 6). Негативне вредности ΔG указују да су реакције CT-DNA са испитиваним Pt(II) комплексима спонтане.



Фигура 32. Uv-vis апсорпциони спектри Pt1-Pt4 комплекса пре и након додавања CT-DNA мерени у 0,01 M раствору фосфатног пуфера (PBS) на pH = 7,40 и 37 °C.

5.8.2 Флуоресцентна мерења

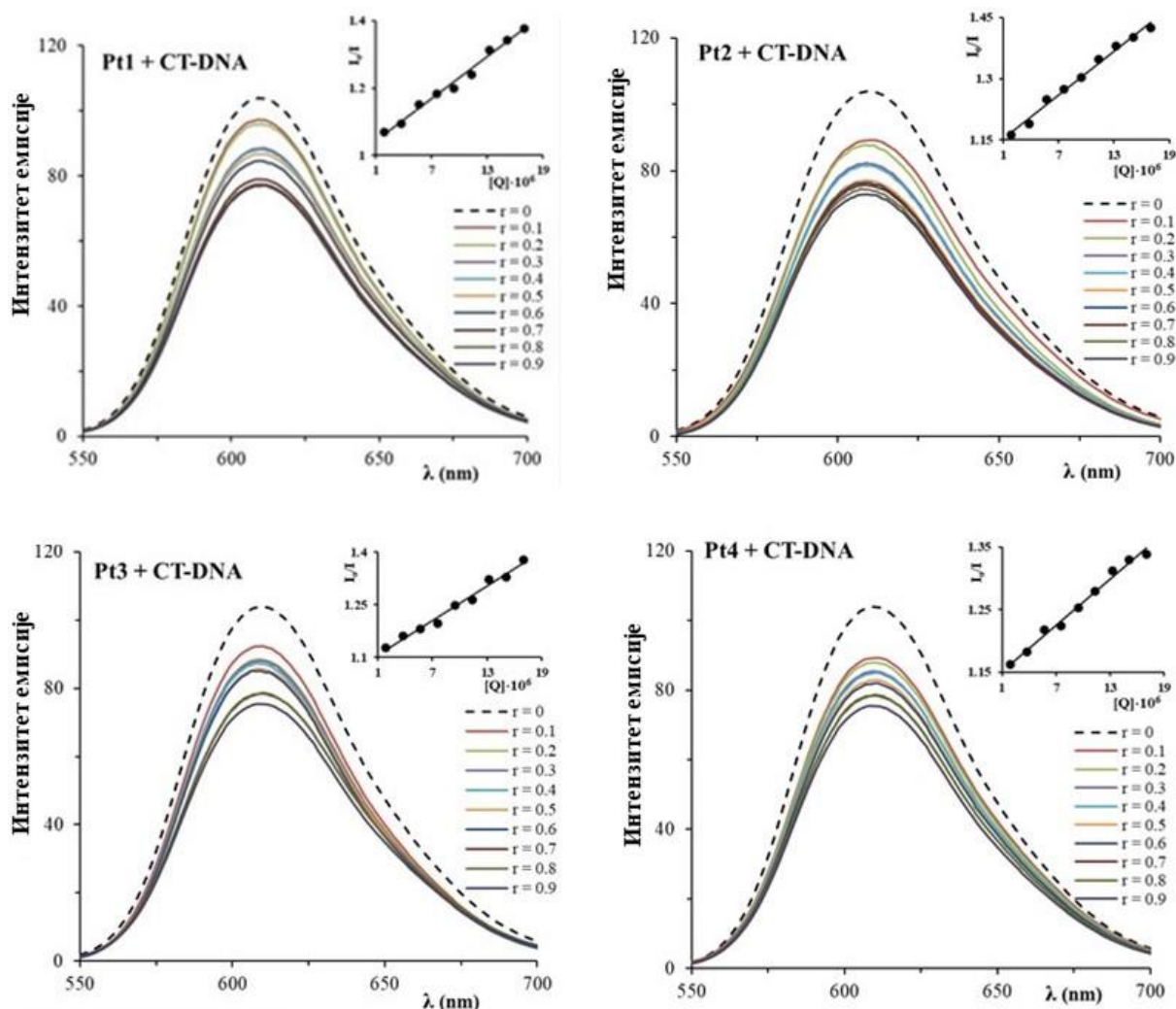
Интеракција платина(II) комплекса са молекулима DNA испитиване су применом емисионе флуоресцентне спектроскопије. За ову врсту испитивања као типичан интеркалатор користи се етидијум-бромид (EtBr). Додатак раствора комплекса у раствор EtBr/CT-DNA узрокује промене у емисионим спектрима на основу чега се проучава интеракција комплекса са DNA. Промене у емисионим спектрима након додатка комплекса могу довести до смањења или повећања флуоресцентне емисије што указује да у раствору настаје нови адукт CT-DNA/Pt(II) комплекс након супституције EtBr.

Емисиони сектри EtBr/ CT-DNA у присуству Pt1-Pt4 комплекса приказани су на фигури 33. Интензитет емисије EtBr/ CT-DNA на 612 nm се значајно смањено са додатком раствора комплекса Pt(II) (концентрација комплекса се повећава), што указује на то да се комплекси могу везати за DNA и истиснути EtBr из EtBr/ CT-DNA система.

Добијени резултати су анализирани помоћу *Stern–Volmer*-ове једначине (Фигура 33). Високе вредности K_{sv} (табела 6) комплекса говоре о њиховом великом афинитету да се чврсто везују за CT-DNA, и да је начин везивања интеркалација. Све израчунате вредности K_{sv} су истог реда, али се може уочити да комплекс Pt1 има највећу вредност константе што указује на то да је малонска киселина као лиганд значајно утицала на начин везивања за CT-DNA. Такође, на основу добијених резултата израчунате су константе стабилности (K_a) и број везујућих места (n) и њихове вредности су дате у табели 7. Константе стабилности (K_a) прате редослед Pt 1 > Pt 2 > Pt 3 > Pt 4, који је у сагласности са вредностима K_b које су добијене применом UV-Vis спектрофотометрије. Број везујућих места (n) у случају свих испитиваних комплекса указује на присуство само једног главног места везивања за CT-DNA (Табела 7). На основу вредности добијених за *Stern–Volmer*-ову константу (K_{sv}), константу стабилности (K_a) и броја везујућих места (n) може се закључити да Pt1-Pt4 комплекси реагују са CT-DNA тако што интеркалирају између два нуклеотидна ланца и истискују EtBr.

5.8.3 Мерења вискозитета

За додатно појашњење начина интеракције нивосинтетисаних комплекса Pt(II) са CT-DNA коришћено је мерење вискозитета. У раствор CT-DNA тачно одређене концентрације која се не мења (10 μ M) додају се различите концентрације (растуће) испитиваних комплекса Pt1-Pt4. Ефекат повећања концентрације раствора Pt1-Pt4 комплекса на релативну вискозност CT-DNA на собној температури дата је на фигури 9. Може се уочити да са порастом концентрације додатог комплекса долази до благог повећања вискозитета раствора CT-DNA што указује да долази до интеркалације испитиваних комплекса за CT-DNA при чему интеркалација није изражена у мери у којој то је примећено у случају класичних интеркалатора.



Фигура 33. Емисиони спектри EtBr/CT-DNA у одсуству и у присуству Pt1-Pt4 комплекса различитих концентрација (растућих). Спектри су снимљени у 0,01 М фосфатном пуферу (PBS), при рН 7,40 и на собној температури. Инсертовани график представља зависност I_0/I од концентрације $[Q]$.

5.9 Интеракције мононуклеарних комплекса Pt(II) са говеђим серум албумином

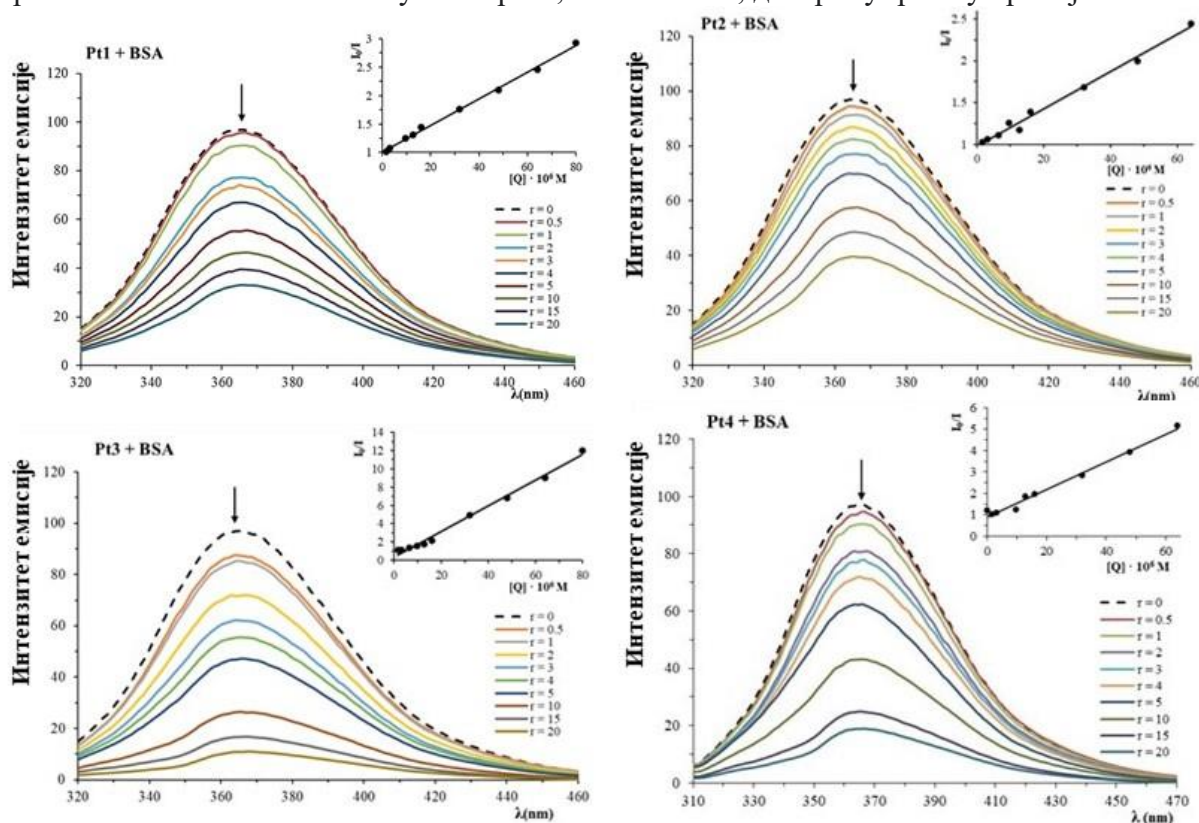
Серум албумин представља најчешћи протеин крвне плазме, због чега је и највише изучаван (315). Веома важна улога овог протеина је транспорт јона метала и њихових комплекса кроз крвни систем до одговарајућих ћелија и ткива. Испитивање интеракција између серум албумина и комплекса јона метала који су нашли медицинску примену су наишле велико интересовање истраживача јер њихова интеракција може смањити или повећати биолошку активност лека, или довести појаве нових начина транспорта лека. Највише проучаван серум албумин је говеђи серум албумин (BSA) због његове велике структурне хомологије са хуманим серум албумином (енгл. *Human serum albumin*, HSA), BSA садржи два остатка триптофана на позицији Trp-134 и Trp-214, док HSA садржи један триптофан, Trp-214.

За праћење интеракција између серум албумина и комплекса јона метала користи се флуоресцентна спектроскопија, при чему се може пратити смањење интензитета флуоресценције због промене околине око триптофана што може открити природу

реакције везивања [36]. Интеракција комплекса Pt(II) са биомолекулом као што је BSA, узрокује промене у секундарној структури протеина и промене у триптофанском окружењу BSA. Раствор BSA показује интензивну флуоресценцију на $\lambda_{em,max} = 352 \text{ nm}$, односно на 295 nm ако је ексцитован (326). По додатку комплекса Pt1-Pt4 у овај раствор долази до смањења интензитета флуоресцентне емисије на $\lambda = 352 \text{ nm}$ (Фигура 34). На основу ових промена може се закључити да испитивани комплекси интерагују са BSA протеином.

Емисиони спектри BSA у присуству Pt1-Pt4 комплекса приказани су на фигури 34. У циљу проучавања механизма гашења флуоресценције при интеракцији између Pt(II) комплекса и BSA, израчунате су вредности динамичке Stern-Volmer-ове константа (K_{sv}) и константе гашења флуоресценције (K_q) помоћу Stern-Volmer-ове једначине (Табела 8). Вредности K_{sv} и K_q за интеракцију комплекса Pt1-Pt4 са BSA указују на добар афинитет комплекса за везивању за BSA. Комплекс Pt3 има већу вредност за K_{sv} у односу на друге Pt(II) комплексе. Штавише, вредности константе гашења K_q за све комплексе су веће 10^{10} што указује на статички механизам гашења флуоресценције (313).

На основу Scatchard-ове једначине израчунате су и бројне вредности константи везивања (K_a) као и број везујућих места (n) албумина за Pt(II) комплексе (Табела 8). Анализа вредности константи везивања (K_a) је прилично корисна јер може да претпостави како ће се молекулска врста, посебно лек, дистрибуирати у крвној плазми.



Фигура 34. Емисиони спектри BSA у присуству Pt1–Pt4 комплекса у 0,01 М фосфатном пуферу (PBS), при рН 7,40 и на собној температури. [BSA] = 2 μM , [Pt(II) комплекс] = 0–40 μM ; $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$. Стрелице показују промену интензитета са повећањем концентрације комплекса. Инсертовани график приказује зависност I_0/I од концентрације [Q].

Вредности K_a комплекса Pt1-Pt4 су довољно високе па се може закључити да се сви комплекси платине(II) везују за BSA. Ипак, ове вредности за Pt(II) комплексе су мање од 10^{15} M^{-1} , вредности коју има авидин са различитим лигандима чија се интеракција сматра најјачом међу познатим нековалентним интеракцијама, тако да су и даље ниске да би указивале на ослобађање везаног комплекса из BSA након што се приближи циљаним ћелијама. Такође, бројна вредност n (~ 1) указује да је само једно место доступно за интеракцију BSA са овим платина(II) комплексима.

5.10 *In vitro* антиканцерска активност комплекса Pt1-4

5.10.1 Pt3 комплекс смањује вијабилност ћелија мишијег карцинома дојке

Први корак у истраживању новосинтетисаних комплекса на бази метала представља *in vitro* анализа цитотоксичке активности њиховог ефекта на ћелијске линије коришћењем МТТ теста. МТТ тестом је испитивана вијабилност линија малигних и немалигних ћелија, третираних новосинтетисаним комплексима платине(II), цисплатином, карбоплатином и 5,6-ероху-1,10-phen лигандом. МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma–Aldrich, Munich, Germany), је жути кристал, који се у метаболички активним ћелијама, редукује до љубичастих кристала формазана. Како је митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа) активна само у живим ћелијама, тако је редукација првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија.

Резултат од значаја, добијен МТТ тестом, представља вредност инхибиторне концентрације - IC50, концентрације која ће смањити број живих ћелија за половину. Добијене вредности инхибиторних концентрација за све испитиване комплексе, цисплатину, карбоплатину и лиганд приказане су у табели 9.

Анализом IC50 вредности којима су третиране линије туморских ћелија 4T1, СТ26 и НСТ116, добили смо податке да новосинтетисани комплекси Pt1-4 након 48 сати инкубације смањују вијабилност туморских ћелија свих испитиваних линија, на дозно завијан начин (Фигура 10). Pt3 комплекс након 48 сати инкубације постиже ефекат при најнижим концентрацијама (Табела 9).

Слично нашим резултатима, *Sun* и сарадници су публиковали да су четири испитивана комплекса платине са фенантролином показала значајну цитотоксичност против ћелијских линија хуманог колоректалног карцинома (НСТ-116), хуманог хепатоцелуларног карцинома (HepG2) и хуманог неситноћелијског карцинома плућа (A549). Анализом резултата цитотоксичког ефекта на ћелије хуманог колоректалног карцинома, испитивани комплекси су испољили значајан ефекат у поређењу са оксалиплатином, цисплатином и карбоплатином (327).

Backman-Blanco и сарадници су испитивали цитотоксичност шест комплекса платине са фенантролином, означених као Pt(1,10-phenanthroline)(SArFn)₂ комплекси, на ћелијским линијама хуманог колоректалног аденокарцинома (НСТ-15), хуманог карцинома дојке (MCF-7), хумане хроничне мијелоидне леукемије (K562), хуманог глиобластома (U-251), хуманог аденокарцинома простате (PC-3) и хуманог аденокарцинома плућа (SKLU-1). Испитивани комплекси су показали значајни цитотоксични ефекат против поменутих ћелијских линија, при чему је најбољи ефекат показао комплекс 1 (328).

Krause-Heuer и сарадници су показали да додаток 1,10-phenanthroline-а молекулу платине обезбеђује ефикасније једињења са значајним цитотоксичним ефектом, на различитим ћелијским линијама хуманог карцинома: хуманог карцинома мокраћне

бешике (RT-4), хуманог карцинома плућа (A427 и LCLC-103H), хуманог карцинома панкреаса (DAN-G), хуманог карцинома дојке (MCF-7) и хуманог карцинома оваријума (A2780) (329).

Испитивана је цитотоксичност динуклеарних Pt(II) комплекса са фенантролином, на мишјим ћелијама карцинома дојке (4T1) и хуманим ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231). Слично нашим резултатима, испитивани комплекси су показали значајан цитотоксични ефекат на 4T1 ћелијску линију карцинома дојке у поређењу са цисплатином и оксалиплатином. Цитотоксични ефекат испитиваних комплекса је зависио од примењене дозе: повећање концентрације испитиваних комплекса је повећавао цитотоксични ефекат на канцерским ћелијским линијама (330).

Kononov и сарадници су испитивали цитотоксични ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) са нафтиридином. Супротно нашим резултатима, испитивани динуклеарни комплекси платине су показали мањи цитотоксични ефекат на ћелијским линијама карцинома дојке (4T1 и MDA-MB-468), карцинома колона (CT26 и HCT116) и карцинома плућа (A549) у поређењу са цисплатином (331).

Hadian Rasanani је пратио цитотоксички ефекат платина (II) комплекса са фенантролином и паладијум комплекса са диаминоциклохексаном, на ћелијским линијама хуманог колоректалног карцинома. Испитивани комплекси платине су показали бољи цитотоксични ефекат у поређењу са комплексима паладијума. То указује да присуство платине у централном делу комплекса има значајан утицај на супресију раста туморских ћелија хуманог колоректалног карцинома HCT116 (332).

Идеалан комплекс био би онај који не делује на здраве ћелије, или да барем показује слабу цитотоксичност за здраве ћелије. Стога је циљ нашег даљег истраживања монокларних комплекса платине Pt1-4 било испитивање утицаја на нетуморске, мезенхималне матичне ћелије. При вишим концентрацијама сви испитивани комплекси показали су цитотоксички ефекат, док су при нижим концентрацијама (15.63 -125 микромола по литру) показали низак степен токсичности (Фигура 10). Нижа цитотоксичност може указати на селективну токсичност новоиспитиваних комплекса платине према туморским ћелијама, што би могло указати на бољу толеранцију *in vivo*. Испитивали смо индекс селективности новоиспитиваних комплекса, цисплатине, карбоплатине и лиганда на ћелијским линијама 4T1 и CT26. Резултати су приказани кроз индекс селективности (Табела 10). Pt3 комплекс је најселективнији међу свим испитиваним агенсима за обе поменуте линије туморских ћелија. Индекс селективности за ћелијску линију 4T1 за Pt3 комплекс износи 1.9; за цисплатину 0.9; за карбоплатину 1.2; за лиганд 1,5. Индекс селективности за ћелијску линију CT26 за Pt3 комплекс износи 1.5; за цисплатину 0.7; за карбоплатину 1.0; за лиганд 0,7 (Табела 10).

5.10.2 Pt3 комплекс стимулише апоптотску смрт ћелија мишјег карцинома дојке

Како смо доказали да новосинтетисани комплекси платине показују селективну цитотоксичну активност на ћелијске линије мишјег карцинома дојке и колоректума, поставили смо питање који је то начин на који остварују свој ефекат? Од раније је познато да се у основи канцерогенезе и резистенције малигних ћелија на цитостатике, налази поремећај у регулацији апоптозе. Стога се настоји да новим хемиотерапијским агенсима делује управо кроз стимулацију процеса апоптозе. Обзиром да смо показали да новоиспитивани комплекси платине(II) испољавају цитотоксичну активност, посебно најселективнији новоиспитивани комплекс означен као Pt3, наше даље истраживање било је усмерено на детекцију доминантног типа ћелијске смрти.

Апоптоза или програмирана ћелијска смрт је добро регулисан процес ограничен само на појединачне ћелије, без оштећења околних ћелијских структура и без покретања запаљенске реакције, тако да је индукција апоптозе ефикасан метод у терапији карцинома (333). Апоптозу прате карактеристичне морфолошке промене (334). Иницијално се губе међућелијске везе, кида се цитоскелет, а укупни волумен ћелије се смањује. Следи пикноза, а потом и деградација једра (335). Молекул DNA се фрагментира, ендоплазматски ретикулум се дилатира, а из митохондрија се ослобађа ситохром-с (336). Плазма мембрана се изврће и на крају се формирају апоптотска телашца, која садрже делове цитоплазме са морфолошки очуваним органелама и деловима нуклеуса. Апоптотска телашца привлаче околне фагоците – макрофаге и дендритске ћелије које ће ингестирати апоптотска телашца и дезинтегрисати их у фаголизозомима. Очуваност ћелијске мембране, спречава изливање ћелијског садржаја у околину ћелије, због чега изостаје инфламација интерстицијалног ткива (337). Апоптоза омогућава нормалан раст, развој и одржавање хомеостазе ткива. Игра важну улогу током ембрионалног развоја, незаобилазна је током процеса имплантације јајне ћелије и за успостављање неуронских синапси. Касније током живота, процесом апоптозе уклањају се кератиноцити приликом миграције ка површним слојевима коже, аутореактивни Т и В лимфоцити, а у завршној фази имунског одговора елиминишу се ефекторске ћелије. Представља генетски контролисан процес, током кога ћелија активно учествује, уз одговарајући утросак енергије (338). Молекуларни механизми регулације апоптозе, функционално су повезани са механизмима контроле ћелијског циклуса, пролиферације ћелије и геномске стабилности. У основи малигних обољења налази се поремећаји контроле ћелијског раста, односно ћелијског циклуса или процеса апоптозе (339). Поред морфолошких промена, током процеса апоптозе настају и бројне биохемијске промене. Извртање ћелијске мембране експримира фосфатидил -серин са спољашње стране мембране, што обележава ћелију за следствену фагоцитозу, што је „eat me“ сигнал за фагоците (340). Хумани антикоагуланс AnnexinV је Ca²⁺ зависни протеин, масе 35-36 kDa, који се везује за остатке фосфатидилсерина на површини ћелије у апоптози и служи као маркер праћења појаве апоптозе (341). Индукција апоптозе подразумева активацију цитосолних ензима –каспаза. Каспазе су високо специфичне протеазе. Синтетишу се у ћелији као неактивни прекурсорни, прокаспазе. Активирају се протеолитичким цепањем и покрећу иреверзибилну протеазну каскаду. Једном активирана каспаза активира остале каспазе, односно појачава апоптотски сигнал. Разликујемо иницијаторске каспазе (каспаза 2, 8, 9 и 10) и егзекуторске, ефекторске каспазе (каспаза 3, 6 и 7). Каспазе делују на кључне регулаторе апоптозе, ензиме који учествују у регулацији ћелијског циклуса или су укључени у механизме поправке оштећења молекула DNA (342). Постоје три сигнална пута активације апоптозе: спољашњи пут, преко активације рецептора смрти, унутрашњи или митохондријални пут и трећи пут, деловањем перфорина и гранзима (343, 344). Молекули ангажовани у једном путу могу активирати други сигнални пут и појачати ефикасност самог процеса апоптозе (336).

Спољашњи пут апоптозе се покреће везивањем лиганда директно за рецепторе са спољашње стране ћелијске мембране, означене као рецептори смрти: TNF, Fas, CD40 и TRAIL рецептори. Интеракција лиганд/рецептор покреће регрутацију адаптерних протеина и формирање DISC (енгл. *Death inducing signalling complex*, DISC) комплекса, након чега новонастали комплекс из форме проензима активира каспазе 8 и 10, које даље активирају ефекторску каспазу-3 која покреће апоптозу (345-347).

Митохондрије играју значајну улогу у преносу апоптотских сигнала из унутрашњости ћелије, тако што оксидативни стрес, оштећења молекула DNA, дефицит фактора раста, нутријената или ефекат хемиотерапеутика (348, 349) повећавају пермеабилност

мембране митохондија те се поједини проапоптотски протеини, попут цитохрома-с, ослобађају у цитосол (350). Ослобођени цитохром-с формира комплекс са адаптерним протеином Araf-1 (енгл. *Apoptosis protease-activating factor*, Araf-1), који даље активира каспазу 9, при чему настаје апоптозом, који активира каспазу 3, последњу у низу каспаза, која сече актинске нити цитоскелета и узрокује настанак претходно описаних морфолошких промена (351).

Апоптоза индукована перфоринима и гранзимима, подразумева стварање пукотина на ћелијској мембрани кроз које гранзими А и В доспевају у унутрашњост ћелија, активирају дееназе или каспазе и финално покрећу програмирану смрт ћелије (352).

Тип ћелијске смрти анализиран је методом проточне цитометрије, 24 сата након излагања испитиваном комплексу, Pt3 и цисплатини. Туморске ћелије линија 4T1, СТ26 и НСТ116 су затим бојене анексином V и пропиридијум јодидом, након чега је одређиван проценат вијабилних ћелија. Контролне ћелије испитиваних линија 4T1, СТ26 и НСТ116 нису третиране поменутиим супстанцама, већ су само гајене у медијуму. Проточна цитометрија је показала да новоиспитивани комплекс платине(II), означен као Pt3, индукује апоптотску смрт туморских ћелија испитиваних линија. Након 24 часа излагања Pt3 комплексу већина 4T1 ћелија била је у касној апоптози 21,40% (Фигура 11). Процент 4T1 ћелија у раној апоптози износио је 8,18%, док је у некрози након излагања новоиспитиваном комплексу било 6,90% 4T1 ћелија. Процент 4T1 ћелија након 24 сата излагања цисплатини износио је 26,2% у раној апоптози, у касној 19,1%, а 4,95% у некрози (Фигура 11). Процент 4T1 ћелија које нису фармаколошки третиране износио је 2,31% у раној апоптози, у касној апоптози 5,32%, а 1,51% ћелија био је у некрози (Фигура 11).

Након 24 часа излагања Pt3 комплексу већина СТ26 ћелија била је у раној апоптози 19,4%. Процент 4T1 ћелија у касној апоптози износио је 10,1% , док је у некрози након излагања новоиспитиваном комплексу било 3,58% СТ26 ћелија (Фигура 12). Процент СТ26 ћелија након 24 сата излагања цисплатини у раној фази апоптозе износио је 13,4, у касној фази апоптозе 16, 9%, а у некрози 5,39%. Процент СТ26 ћелија које нису фармаколошки третиране износио је у раној фази 2,55%, у касној фази апоптозе 2,88%, док је у некрози било 3,34% ћелија (Фигура 12).

Након 24 часа излагања Pt3 комплексу већина НСТ116 ћелија била је у касној апоптози 18%. Процент НСТ116 ћелија у раној апоптози износио је 9%, док је у некрози након излагања новоиспитиваном комплексу било 3,90% НСТ116 ћелија (Фигура 13). Процент НСТ116 ћелија након 24 сата излагања цисплатини у касној апоптози износио је 25%, у раној апоптози 20,2%, док је у некрози било 1,99% третираних НСТ116 ћелија (Фигура 13). Процент НСТ116 ћелија које нису фармаколошки третиране износио је 4,02% у касној апоптози , у раној апоптози 4,04%, док је 1,0% третираних ћелија било некротично (Фигура 13).

Наши резултати указују новоинтетисани Pt3 комплекс, након 24 сата изложености покреће апоптозу туморских ћелија карцинома дојке и карцинома колоректума, што је у складу са подацима из доступне литературе.

Šun и сарадници су испитивали Pt(II) комплекс са 1,10- фенантролином и показали да третирање ћелијске линије хуманог колоректалног карцинома, НСТ-116, узрокује апоптозу 95% третираних ћелија у односу на цисплатину која узрокује апоптозу 90% третираних ћелија (353).

Марковић и сарадници су пратили ефекат примене динуклеарних Pt(II) комплекса са фенантролином, на проценат ћелија које се налазе у раној фази апоптозе, касној фази апоптозе као и проценат ћелија у некрози. У складу са нашим резултатима, двадесет-четворочасовно излагање 4T1 ћелија мишијег карцинома дојке новосинтетисаним динуклеарним комплексима платине је значајно повећало проценат ћелија које се

налазе у раној и касној апоптози у поређењу са нетретираним ћелијама. Слично налазима из наше студије, највећи проценат 4T1 ћелија третираних C2 динуклеарним комплексом платине је био у касној апоптози. Примена испитиваних комплекса је значајно смањила вијабилност кацерских ћелија које су доминантно умирале апоптозом. Само мали проценат третираних ћелија (<7%) су биле некротичне, што је у складу и са нашим резултатима (330).

Qin сарадници су испитивали ефекат примене новосинтетисаних комплекса платине са фенантролином, означених као [PtII(L)(pn)]Cl·2H₂O (pn = 1,3-*propanediamine*) са 2-(4-*methoxy-phenyl*)imidazol[4,5-f]-[1,10]phenanthroline, на апоптозу *HeLa* туморских ћелија. Третирање *HeLa* ћелија новосинтетисаним комплексом платине је повећало проценат ћелија који се налазе у раној апоптози. Новосинтетисани комплекс је стимулисао апоптозу, што је показано и морфолошком анализом једара *HeLa* ћелија која су након третирања комплексом постала кондензована и са повећаним бројем једараца (354).

Qin и сарадници су проучавали и ефекат новосинтетисаних комплекса платине са фенантролином на појаву апоптозе ћелија карцинома оваријума (SK-OV3/DDP). Након третирања поменути комплексима значајно се повећао проценат ћелија које су се налазиле у раној апоптози у поређењу са ћелијама које су третиране цисплатином (355).

Показано је да Pt(II) комплекс са фенантролином узрокује апоптозу туморских *HeLa* ћелија. Једра *HeLa* ћелија које су 24h третирана новосинтетисаном комплексом платине су постала мања, кондензованог хроматина, а број апоптотских телашаца се повећао. Документовано је да је индикована апоптоза *HeLa* ћелија дозно-зависан феномен (354). Највећи проценат ћелија линија 4T1 и HCT116, након 24 часа изложености Pt3 комплексу, био је у некрози, док је највећи проценат ћелија у некрози постигнут применом цисплатине на ћелијској линији CT26. Третман цисплатином је показао виши проапоптотски капацитет у поређењу са Pt3 комплексом, пре свега, значајним повећањем процента ћелија у раној апоптози (Фигура 11, 12, 13).

5.10.3 Pt3 комплекс смањује проценат ћелија које експримирају антиапоптотске протеине BclXL и Bcl-2

Претходним експериментима смо показали да је новосинтетисани Pt3 комплекс смањив вијабилност туморских ћелија и индуковао апоптозу туморских ћелија. Наредним експериментом смо испитивали експресију протеина који учествују у апоптози. Процес апоптозе је строго контролисан, фамилијама регулаторних протеина, од којих су најзначајнији молекули Bcl-2 фамилије (енгл. *B lymphoma cell*, Bcl) који се још називају чуварима мембране митохондрија (5). Молекули Bcl-2 фамилије се могу поделити на проапоптотске (Bcl-10, Bax, Bid, Bim, Bad, Bak i Bik) који стимулишу процес апоптозе и антиапоптотске (Bcl-2, Bclx, Bclw, BclXS, BclXL, BAG) који инхибирају процес апоптозе (356). Даље смо проточним цитометријом одређивали експресију протеина BclXL и Bcl-2, након 24 часа излагања туморских ћелија испитиваних линија, Pt3 комплексу или цисплатини.

Bcl-2 фамилија протеина је кључна у регулацији унутрашњег пута апоптозе (357). Играју улогу у модулацији пропустљивости мембране митохондрија и тако регулишу ослобађање проапоптотских фактора из интермембранског простора у цитоплазму (358). Фамилија Bcl-2 протеина укључује преко 20 протеина који садрже један од четири хомолога домена (BH) са главним доменом (BH3), неопходним за хетеродимеризацију између појединих протеина и апоптозу и могу се поделити на проапоптотске и антиапоптотске молекуле (359). Проапоптотски чланови Bcl-2

фамилије су подељени у две групе: више доменске Bcl-2 протеине, BH123 (Bax, Bak, Mtd-Bok i Bcl-2 -Rambo) и „BH3-only“ протеине, који имају само један BH3 домен (Bid, Noxa, Puma, Bad, Bik, Hrk, Blk), а прва три се сматрају најпотентнијим. Представници BH123 су Bax и Bak, структурно слични молекулу Bcl-2 (360). Молекули Bax и Bid детектују оштећење ћелије, везују се за спољашњу мембрану митохондрија, мењају јој пропустљивост, омогућавају ослобађање садржаја митохондрија у цитосол и на тај начин покрећу апоптозу. „BH3-only“ протеини се могу поделити на активаторе Bax/Bak протеина и инхибиторне молекуле (Bad) који активирају Bcl-2 i BclXL и остале антиапоптотске молекуле. Дакле, „BH3-only“ протеини индукују апоптозу: повећањем пропустљивости мембране митохондрија, активацијом проапоптотских протеина или инхибицијом антиапоптотских протеина (356). Антиапоптотски протеини фамилије Bcl-2 протеина: су Bcl-2, Bclx, Bclw, BclXS, BclXL, BAG, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-1, Bcl-2 и локализовани су на спољашњој страни мембране митохондрија. Bcl-2 је представник антиапоптотских протеина који превенира ослобађање цитохрома-с и последичну апоптозу активiranу унутрашњим путем (361). Bcl-2 протеин је прототип антиапоптотских протеина и први откривени протеин истоимене фамилије. Са проапоптотским протеинима формира хетеродимере. Конститутивно је експримиран на спољашњој мембрани митохондрија, тако да стабилише мембрану и спречава ослобађање садржаја митохондрија у цитосол. Димеризацијом са Bax протеином спречава покретање процеса апоптозе (362). Молекул Bcl-2 је високо експримиран у карциномима мале величине, добре хистолошке диференцијације са одсутном или минималном некрозом што је у складу са његовом улогом инхибитора апоптозе (363). Висока експресија Bcl-2 молекула виђа се у око 80% карцинома дојке. *In vitro* студије на ћелијским линијама карцинома дојке су показала да Bcl-2 молекул утиче на ефикасност цитотоксичких лекова (364). Тако, у студији *Yang et al.* Bcl-2 поспешује развој резистенције малигнућ ћелија на примену цитотоксичких лекова (365, 366), док су *Del Bufalo* и сарадници (367) показали да Bcl-2 поспешује ефикасност терапеутика. Естроген, олакшава развој резистенције малигнућ ћелија на терапеутике, што објашњава стимулаторни ефекат естрогена у смислу повећања експресије Bcl2 молекула (368, 369). Друга истраживања су показала да је Bcl-2 појачано експримиран у G1 фази ћелијског циклуса. Ћелије заостају у G1 фази, одлаже се прелаз у синтетску фазу што опет може објаснити настанак резистенције на терапеутике (370). У студији (371) показали су да Bcl-2 продужава трајање ћелијског циклуса и снижава ћелијску фракцију у S фази.

Инхибитори апоптозе (енгл. *Inhibitors of apoptosis*, IAPs) чине другу фамилију регулаторних протеина апоптозе, који се везују за каспазе и инактивирају их. Најзначајнији представници IAPs су Smac (DIABLO) i Omi. Поред Bcl-2 и IAPs протеина, значајну улогу у апоптози играју и тумор супресорски протеин p53, као и прото-онкоген c-Myc (372-374). Протеин p53 кроз детекцију непоправљивих оштећења молекула DNA, покреће апоптозу посредством Fas рецептора, Bcl-2 проапоптотских протеина и ослобађањем цитохрома-с (375), док c-Myc узрокује апоптозу појачањем експресије узрокујући инхибицију Mdm2, главног негативног регулатора p53 гена (372). У карциному дојке, малигне ћелије су успеле да заобиђу p53-зависну апоптозу, управо кроз повећану активност Mdm2 (376).

У нашој студији анализирали смо експресију кључних антиапоптотских молекула, Bcl-2 и BclXL на ћелијским линијама 4T1, CT26 и HCT116, након 24-часовног третмана новоиспитиваним комплексом и цисплатином, методом проточне цитометрије (Фигуре 14-16).

Процентуални удео 4T1 ћелија које експримирају Bcl-2, износио је 6,01% након третмана Pt3 комплексом, 5,49% након третмана цисплатином, а 22,2% у нетретираним

ћелијама (Фигура 14). У ћелијској популацији СТ26 проценат ћелија третираних Pt3 комплексом које експримирају Bcl-2, износио је 13,4%, ћелија третираних цисплатином 11,9% и нетретираних ћелија 25,6% (Фигура 15). Процент експресије Bcl-2 у популацији НСТ116 ћелија третираних Pt3 комплексом износио је 2,87%, третираних цисплатином 2,44%, а нетретираних ћелија 6,25% (Фигура 16). Такође смо пратили и експресију молекула BclXL на испитиваним ћелијским популацијама третираним Pt3 комплексом или цисплатином. Процент 4T1 ћелија третираних Pt3 комплексом, које експримирају BclXL износио је 6,45%, третираних цисплатином 5,58% а нетретираних ћелија 11,1% (Фигура 14). У популацији туморских СТ26 ћелија проценат експресије након третмана Pt3 комплексом 10,3%, цисплатином 9,45% и нетретираним ћелијама 17,6 % (Фигура 15). Процентуални удео НСТ116 ћелија третираних Pt3 комплексом које експримирају BclXL износио је 4,12% , третираних цисплатином 3,14% и нетретираних ћелија 5,98% (Фигура 16).

Постоји статистички значајно смањење експресије оба анализирана антиапоптотска протеина у свим испитивани линијама туморских ћелија третираним Pt3 комплексом, односно цисплатином у односу на нетретиране ћелије. Процент ћелија које експримирају BclXL и Bcl-2 је сличан у групама третираним Pt3 комплексом и цисплатином, без статистичке разлике у експресији (Фигуре 14-16).

Yilmaz и сарадници су испитивали антитуморске ефекте нових Pt(II) комплекса са тетраденантним лигандом. Нађено је да је примена новосинтетисаних комплекса платине повећала експресију инактивираниог антиапоптотског Bcl-2 молекула у третираним ћелијским линијама MDA-MB-231 (хумани аденокарцином дојке) и A549 (хумани карцином плућа) што је узроковало преминацију про-апоптотских молекула, слично нашим резултатима (377). Слично, новосинтетисани комплекси платине са триденантним лигандом су супримирали експресију Bcl-2 молекула у ћелијским линијама карцинома дојке (MCF-7), троструко негативног карцинома дојке (MDA-MB-231) и HER-2 позитивном карциному дојке (SKBR3) (378).

Потом је, праћена експресија гена за Bcl-2 протеином методом RT-qPCR. Примена Pt(II) комплекса са 8-аминокинолином (означен као Pt-8AQ) у ћелијским линијама глиобластома и мезотелиома је резултирала смањеном експресијом гена за антиапоптотски протеин Bcl-2 чиме је значајно стимулирана апоптоза третираних ћелија (378).

У складу са нашим подацима нађено је да новосинтетисани комплекси платине означени као Pt(L1)(DMSO)Cl након примене у ћелијској линији хуманог аденокарцинома желуца (MGC80-3) смањују експресију антиапоптотског молекула Bcl-2, што је праћено повећаним ослобађањем цитохрома-с и повећаном степеном апоптозе туморских ћелија (379).

5.10.4 Pt3 комплекс повећава проценат ћелија које експримирају каспазу -3

Каспаза-3 се сматра најважнијом ефекторском каспазом и активира се било којом иницијаторском каспазом. Претходна истраживања показују да каспаза-3 активира CAD ендонуклеазе које су спрегнуте својим инхибитором ICAD (336, 380). У апоптотским ћелијама активирана каспаза-3 одваја ICAD и ослобађа CAD, који разграђује хромозомску DNA и узрокује кондензацију хроматина (380). Такође индукује реорганизацију цитоскелета и дезинтеграцију ћелије до апоптских тела (380). Наши резултати су показали да је у популацији 4T1 ћелија третираних Pt3 комплексом, 17,3% ћелија експримирало је активну каспазу-3 (Фигура 17). У популацији 4T1 ћелија третираних цисплатином каспазу-3 је експримирало 19,6% ћелија, а у популацији нетретираних ћелија свега 5,22% (Фигура 17). У популацији

ST26 било је 12,4% ћелија које експримирају каспазу-3 у групи третираној Pt3 комплексом, 16,9% у групи третираној цисплатином и 5,96% у нетретираној групи ћелија (Фигура 18). Такође, експресија каспазе-3 у популацији ћелија HCT116 третираних Pt3 комплексом је износила 16,5%, у популацији третираној цисплатином 18,8%, док је 9,67% нетретираних ћелија експримирало каспазу-3 (Фигура 19).

Krause-Heuer и сарадници су испитивали степен активације каспазе-3 у хуманим леукемијским ћелијама HL-60 након третирања Pt(II) комплексом са 1,10-фенантролином. Познато је да је цисплатина ефикасан активатор каспазе-3. Сличан ефекат цисплатини је показан након примене комплекса платине где је запажена појачана активност каспазе-3 са морфолошким променама које су карактеристичне за апоптозу: бубрење ћелијске мембране и последично формирање апоптотских телашца (381). У складу са нашим резултатима, *Flow* цитометријска анализа третираих туморских *HeLa* ћелија са новосинтетисаним комплексом Pt(II) са фенатролинским дериватом је показала значајно повећање процента ћелија које експримирају каспазу-3 (354). Резултати слични нашим, добијени су и код примене других комплекса платине. Наиме, након примене *trans*- Pt(II) комплекса са аминоксифлавонским дериватом код леукемијских ћелија (L1210) запажена је појачана активност каспазе-3 код 40% третираних ћелија, док је свега 10% третираних ћелија цисплатином показало појачану активност исте (382).

Активност каспазе-3 одређивана је колориметријском анализом, из лизата ћелијске линије хуманог аденокарцинома дојке (MDA-MB-231). Примена Pt(II) комплекса са бидентнатним N₂O дозором је праћена појачаном активношћу каспазе-3, након 24h третирања ћелијске линије поменути комплексом, што је у слично резултатима добијеним у нашем истраживању (383).

Сумарно, Pt3 комплекс:

- повећава проценат туморских ћелија у раној и касној апоптози,
- смањује експресију антиапоптотских протеина BclXL и Bcl-2,
- повећава проценат туморских ћелија које експримирају каспазу-3.

На основу свих наведених резултата може се закључити да Pt3 комплекс стимулише апоптозу туморских ћелија карцинома дојке и колоректума, са значајно вишим проапоптотским ефектом, у односу на комерцијални антиканцерски лек - цисплатину, односно да испољава антипролиферативни ефекат на испитиваним ћелијским линијама.

5.10.5 Pt3 комплекс смањује пролиферацију ћелија мишјег карцинома дојке

Пролиферативни потенцијал је веома важна карактеристика туморских ћелија и дефинише се одређивањем пролиферацијског индекса, Ki-67 (384).

Пролиферацијски индекс, Ki-67 је нуклеарни антиген, DNA везујући протеин (повезан са хетеро и еухроматином), активан у свим фазама ћелијског циклуса (G1, S, G2, M), осим у G0 фази. Дакле, експримира се само у ћелијама у пролиферацији. Током G1 и у раној S фази, је физиолошки на ниском нивоу, затим расте током S и G2 фазе и највећи је током фазе ћелијске деобе, митозе. Ген који кодира Ki-67 се налази на дугом краку 10. хромозома (10q25). Одређује се квантитативним и квалитативним методама: имунохистохемијском анализом, електронском микроскопијом, ELISA методом, проточном цитометријом и имуноцитохемијом (385). Такође представља веома важан фактор у градирању тумора, као и веома значајан прогностички параметар многих малигних болести (386). Процент експресије маркера Ki-67, најчешће се користи за одређивање пролиферацијског стауса ћелија, посебно код карцинома дојке и простате

(387). Иницијално се Ki-67 користио у дијагностици Ходжкиновог лимфома. Обзиром да HPV узрокује пролиферацију епителних ћелија, повећање експресије Ki-67 може указати на HPV инфекцију (388). Бројне студије су показале да имунопозитивност на Ki-67 линеарно расте са прогресијом стадијума CIN-а, до карцинома грлића (389, 390). У последње време се за скрининг интраепителних неоплазми често користи p16/Ki-67 коекспресија, посебно код неоплазми дојке вишег градуса (391) овај однос представља веома важан прогностички параметар. Тумори који имају виши проценат ћелија у пролиферацији имају лошију прогнозу и краћи интервал до појаве релапса. Запажена је позитивна корелација, експресије Ki-67 са HER-2 и p53, док је Ki-67 обрнуто пропорционалан експресији ER и PR (392).

Наши резултати су показали да је у популацији 4T1 ћелија третираних Pt3 комплексом пролиферацијски индекс износио 6,15%, у популацији третираној цисплатином 5,48% а у популацији нетретираних ћелија 13,5% (Фигура 20).

У популацији СТ26 ћелија третираних Pt3 комплексом пролиферацијски индекс износио је 4,36%, у популацији третираној цисплатином 2,30%, а у популацији нетретираних ћелија 6,45% (Фигура 21).

У популацији 4T1 ћелија третираних Pt3 комплексом пролиферацијски индекс износио је 19,5%, у популацији третираној цисплатином 23,4%, а у популацији нетретираних ћелија 32,9% (Фигура 22).

Слично нашим резултатима, показано је да примена динуклеарних комплекса Pt(II) има снажан антипролиферативни ефекат према ћелијама мишјег карцинома колона (СТ26) (393). Такође, имунохистохемијска анализа анималног модела са мишјим карциномом (NCI-H460) је показала да је експресија пролиферацијског маркера Ki-67 значајно смањена у тумору плућа миша након примене Pt(II) комплекса (394).

5.10.6 Pt3 комплекс смањује миграцију ћелија мишјег карцинома дојке

Ћелијска миграција је процес који почиње у најранијем периоду живота, још током ембриогенезе (гаструлација, ембрионална морфогенеза, развој нервног система, развој васкуларног система и плаценте) и одржава се касније током живота кроз функцију имунског система (395). Онда кад настане малигна трансформација ћелија, миграција туморских ћелија значи и ширење малигног процеса. Ефекат новоиспитиваног комплекса и цисплатине на ћелијске линије 4T1, СТ26 и НСТ116, испитиван је тестом миграције. Наши резултати су показали да је миграторна способност туморских ћелија испитиваних линија, била значајно инхибирана применом Pt3 комплекса и цисплатине. Упоредивањем ефеката Pt3 комплекса и цисплатине, у туморским ћелијама свих испитиваних линија, запажен је израженији ефекат Pt3 (Фигуре 23-25).

Мањи степен миграције ћелија може се објаснити антипролиферативним ефектом новоиспитиваног комплекса, што смо и потврдили анализом пролиферацијског индекса у испитиваним ћелијским линијама, након третмана Pt3 комплексом и цисплатином (фигура . Претпоставља се да би новоиспитивани комплекс вероватно смањило евентуално метастазирање тумора.

Слично нашим резултатима, третирање ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231 и SKBR3) новосинтетисаним комплексима платине са тридентатним лигандом је значајно смањило миграцију карциномских ћелија (396).

5.11 *In vivo* антиканцерска активност комплекса Pt3

5.11.1 Pt3 комплекс смањује величину и волумен примарног тумора дојке

Сви претходно добијени резултати истраживања наметнули су питање: како би се новоиспитивани Pt3 комплекс понашао у живом систему? Даље смо ефекте новосинтетисаног комплекса платине истраживали на анималном моделу карцинома дојке. Женкама мишева индукован је тумор дојке апликацијом туморских ћелија 4T1 директно у млечну жлезду, а затим праћена појава примарног тумора. Даном појаве примарног тумора, почело се са апликацијом новоиспитиваног комплекса и цисплатине. Током експеримента смо морфометријском методом, уз помоћ калипера, мерили дијаметар тумора. До 30. дана експеримента, дијаметар тумора у групи мишева третираних Pt3 комплексом и цисплатином, био је мањи у односу на групу нетретираних мишева, али разлика није постигла ниво статистичке значајности. После 30. дана, у групи мишева третираних Pt3 комплексом и цисплатином, у односу на нетретиране мишеве, туморски раст био је значано спорији, што се одржало до краја експеримента. Наши резултати су показали да је третман Pt3 комплексом и цисплатином, смањивши величину примарног тумора дојке у односу на групу нетретираних мишева (Фигура 26А).

Примена новоиспитиваног Pt3 комплекса је резултирала значајним смањењем волумена тумора дојке у односу на нетретиране експерименталне животиње. Сличан ефекат је запажен и код примене цисплатине (Фигура 26Б). Не постоји статистички значајна разлика у волуменима тумора код примене Pt3 комплекса и цисплатине (Фигура 26Б).

Qin и сарадници су пратили ефекат примене новосинтетисаних комплекса платине(II) са такринским лигандом који су значајно успорили развој анималног хепатоцелуларног карцинома. Примена новосинтетисаног комплекса платине је резултирала смањењем волумена тумора за 40.8% у односу на нетретиране животиње. Овај ефекат је нешто слабији него код примене цисплатине, као контролног једињења, која је узроковала смањење волумена тумора за 58.5% у односу на нетретиране мишеве. Иако је примена цисплатине резултирала већом стопом инхибиције раста хепатоцелуларног карцинома код мишева, примена овог једињења је праћена и већом инциденцом токсичних ефеката, пре свега већим губитком телесне тежине у односу на новосинтетисане комплексе платине са такринским лигандом. Наиме, примена новосинтетисаних комплекса платине је била праћена губитком телесне тежине експерименталних животиња до 14% , док је тај ефекат био израженији код примене цисплатине која је узроковала губитак телесне тежине експерименталних животиња до 21.9% (355). Праћен је ефекат катјонских динуклеарних комплекса Pt(II) на развој хетеротопичног колоректалног карцинома. Поменути новосинтетисани динуклеарни комплекси платине су значајно редукавали раст примарног колоректалног карцинома, као и инциденцу метастаза у плућима и јетри (393). Такође, праћени су ефекти и других комплекса Pt(II). Примена новосинтетисаних комплекса је значајно успорила раст експерименталног аденокарцинома плућа, а ефекат је био сличан примени цисплатине као контролног једињења (397).

5.11.2 Новосинтетисани Pt3 комплекс не испољава токсичност

Највећи проблем у терапији карцинома управо је токсичност хемотерапеутика. Од почетка примене металокомплекса у онкологији до данас, синтетисан је и испитиван велики број различитих аналога од којих је само десетак уведено у клиничку фазу

истраживања. Цисплатина се од давнина користи у онколошкој пракси и представља најчешће коришћен хемиотерапеутик за лечење карцинома плућа, тестиса, јајника, бешике, карцинома главе и врата. Карактерише се добрим антитуморским ефектом, али због своје изразите токсичности, слабе растворљивости у води и развоја резистенције туморских ћелија, терапија цисплатином има бројна ограничења. С тога се настоји да пронађе агенс сличне ефикасности и мање штетан по здраве, неизмењене ћелије, идеално селективан само за туморске ћелије. Даље је наше истраживање имало за циљ, испитивање евенуталне токсичности новосинтетисаног Pt3 комплекса.

Мишевима смо након жртвовања, узимали крв за биохемијску анализу: ALT, AST, уреу и креатинин. Серумске вредности ALT, AST, урее и креатинина у групи мишева третираних Pt3 комплексом, биле су сличне вредностима нетретираних мишева са карциномом дојке (Фигура 27). Серумске вредности ALT, AST, урее и креатинина у групи третираној цисплатином, биле су значајно више у односу на групу третирану Pt3 комплексом, групу нетретираних мишева са карциномом дојке и групу здравих мишева (Фигура 27). На основу ових резултата показали смо да новосинтетисани Pt3 комплекс платине не показује хепатотоксичан и нефротоксичан ефекат у испитиваним групама.

Да би смо имали детаљнију слику о ефектима Pt3 комплекса и корелирали налазе са добијеним резултатима, даље истраживање је уврстило неизоставну патохистолошку анализу. Мишевима смо изоловали јетру, бубреге, плућа и срце и након обраде ткива исечке анализирали у смислу токсичног оштећења (Фигуре 28-31). Евалуацијом патохистолошких промена у појединим органима закључили смо да је оштећење органа, израженије у групи која је третирана цисплатином у односу на групу мишева третирану Pt3 комплексом и групу која мишева која није добијала ни Pt3 комплекс ни цисплатину (Фигуре 28-31).

Neville и сарадници су показали да је Pt(II) комплекс са 1,10-фенантролином показао значајно мању цитотоксичност према ћелијама проксималних тубула бубрега (HK-2). У ниским концентрацијама (IC50 1.7–25 μ M) степен нефротоксичности је био минималан, док је у истом концентрацијском рангу постигнут значајан цитотоксични ефекат против A2780 ћелијских линија оваријалног карцинома и A2780cisR која је означена као цисплатина-резистентна ћелијска линија. Супротно, у истом раду, је описано да је цисплатина цитотоксичнија према ћелијама проксималног тубула бубрега, у односу на ћелије оваријалног карцинома (398). Уједно је показано да испитивани комплекси, супротно од цисплатине, узрокују транзицију морфологије тубулских ћелија бубрега који морфолошки личе на фибробласте, са појачаном активношћу β -галактозидаза и без детектоване продукције ROS. Испитивани комплекси су мање индуковали апоптозу тубулских ћелија бубрега и њихов ћелијски циклус није био поремећен.

Слично нашим резултатима, публиковано је да катјонски динуклеарни комплекси платине(II) узрокују мању нефротоксичност и хепатотоксичност код третираних експерименталних животиња са хетеротопичим колоректалним карциномом и значајно успоравају раст примарног тумора, као и мању инциденцу метастаза у плућима и јетри (393).

Показано је да примена комплекса платине са дитиокарбамантним нуклеосом узрокује мањи степен нефротоксичност у односу на цисплатину. Наиме, примена цисплатине је узроковала код експерименталних животиња већи степен лезија бубрега услед липидне пероксидације проксималних тубула (399).

Ma и сарадници су показали да услед примене цисплатине може настати дисфункција леве коморе и смањење контрактилне способности кардиомиоцита. Сматра се да је у основи стрес ендоплазматског ретикулума и апоптоза због оштећених митохондрија (400). Даља истраживања су показала да су за настанак кардиотоксичности одговорни

слободни кисеонички радикали (401, 402). Као одговор на стрес ендоплазматског ретикулума, настаје повећано стварање GRP78 (енгл. *78-kDa glucose-regulated protein, GRP78*). Последиčno настаје апоптоза, активацијом СНОР и/или JNK терминалних киназа и/или активацијом каспаза-12 зависног пута (403-405). Повећан стварање реактивних кисеоничних радикала настаје узрокује инфламација кроз активацију NF-κB, повећано стварање проинфламацијских цитокина, фактора некрозе тумора алфа TNF-α и хемокина као што је протеин који привлачи моноците, MCP-1 (енгл. *Monocyte chemotaxis proteine 1, MCP-1*) (406). Осим што NF-κB покреће инфламацију, одговоран је и за повреду миокарда (407). Оксидациони стрес такође за последицу има оштећење кардиомиоцита (408). Цисплатина се наводи као агенс који има способност активације тромбоцита и агрегације, као агенс прокоагулантне активности моноцита и оштећења ендотела ћелија што све заједно узрокује кардиотоксичне ефекте (409). Показано је да цисплатина повећава ниво *von Willebrand*-овог фактора и да може смањити ново магнезијума, узроковати вазоспазам и стимулирати ангиогенезу (410-412). *Al-Majed* и сарадници су показали да након третмана цисплатином настаје липидна пероксидација мембране кардиомиоцита услед ослобађања лактат дехидрогеназе и креатинин киназе. Дегенерација и вакуолизација кардиомиоцита као и некроза ћелија срчаног мишића, били су хистолошки верификовани након третмана цисплатином. (413).

У студији која је пратила преживљавање и компликације код пацијената оболелих од карцинома тестиса, показано је да се у плазми може да детектује одређена концентрација цисплатине, чак двадесет година након завршетка третмана цисплатином. Управо код тих пацијената постоји повећан ризик за настанак инфаркта миокарда (414). Код 6% ових пацијената се и догодио инфаркт миокарда. Интерперсонална варијабилност игра значајну улогу у настанку компликација након терапије цисплатином (415, 416).

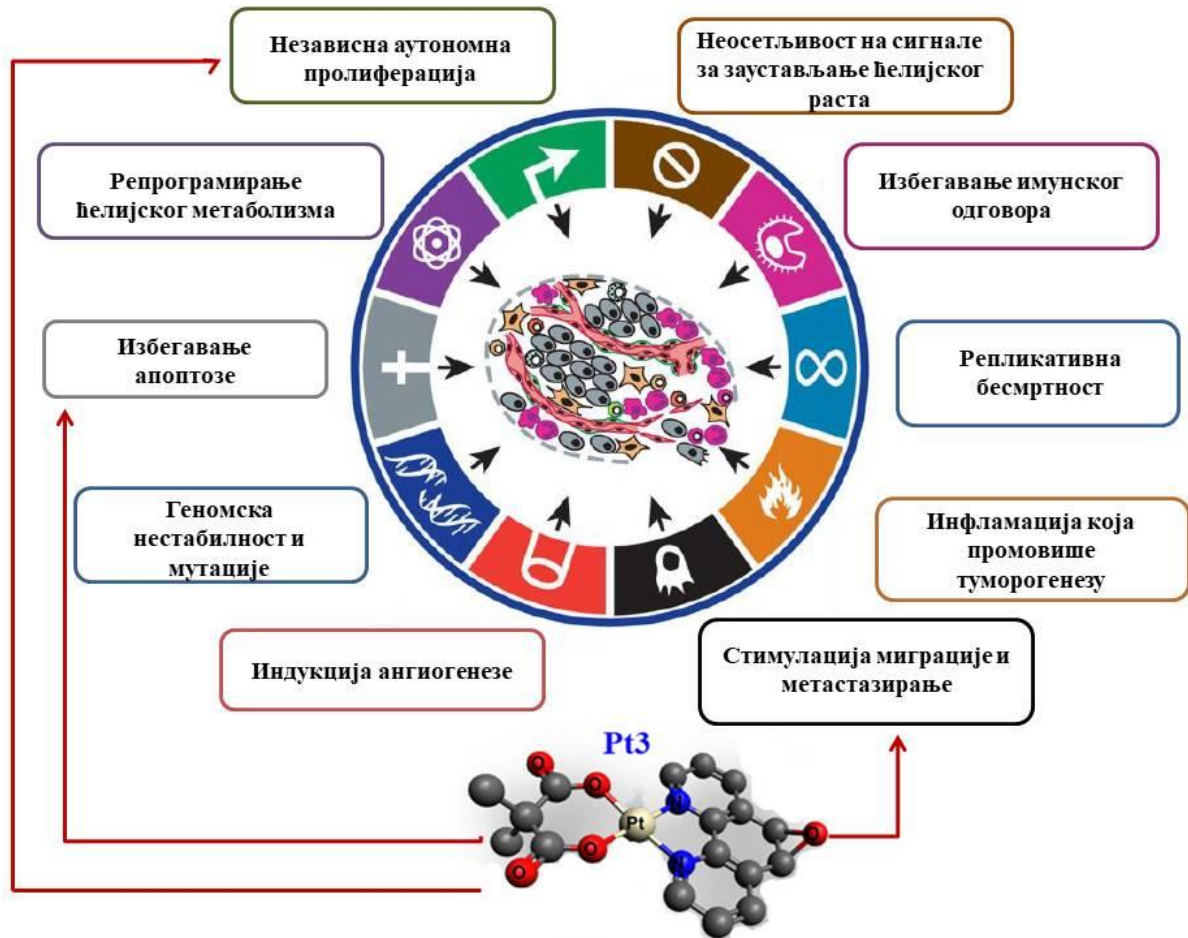
На основу показаних података може се сумирати да новосинтетисани Pt3 комплекс, у мишева са карциномом дојке има повољне ефекте у смислу смањења величине тумора без промене у структури и функцији јетре и бубрега, односно без промене структурних карактеристика срца и плућа. Стога, новосинтетисани Pt3 комплекс платине(II), може бити адекватан кандидат у антитуморској терапији.

6 ЗАКЉУЧАК

У овој студији синтетизована су четири нова мононуклеарна платина(II) комплекса, $[\text{Pt}(\text{L})(5,6\text{-ероху-1,10-phen})]\cdot n\text{H}_2\text{O}$, где је L бидентатно координовани анјон малонске киселине (mal, у комплексу Pt1), 2-метилмалонске (Me-mal, у комплексу Pt2), 2,2-диметилмалонске (Me₂-mal, у комплексу Pt3) и 1,1-циклобутандикарбоксилне (cbdca, у комплексу Pt4) киселине, а 5,6-ероху-1,10-phen бидентатно координован 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролин. Ова студија по први пут показује да новосинтетисани комплекс платине(II) са фенантролином- Pt3, поседује значајну цитотоксичну активност против ћелија карцинома дојке и колоректалног карцинома *in vitro*, као и антитуморску активност *in vivo* у ортотопском 4T1 моделу мишијег карцинома дојке, без значајне токсичности за јетру, бубреге, плућа и срце (Фигура 35). Због свега наведеног сматрамо да комплекс Pt3 има потенцијал да постане кандидат у антитуморској терапији.

Закључци су изведени на основу следећих резултата:

- Структура новосинтетисаних комплекса је потврђена на основу резултата елементарне микроанализе, NMR (1H и 13C) и IR спектроскопије, као и UV-Vis спектрофотометије. Структура комплекса Pt3, $[\text{Pt}(\text{Me}_2\text{-met})(5,6\text{-ероху-1,10-phen})]$, који је добијен у кристалном облику потврђена је на основу рендгенске структурне анализе.
- Комплекси се везују за СТ-DNK, али слабије од класичног интеркалатора. Јачина интеракција зависи од утицаја стерног ефекта анјона дикарбоксилне киселине координоване за платина(II) јон.
- Испитивани комплекси интеркалирају између два нуклеотидна ланца уз истискивање етидијум-бромида. Интеркалација комплекса је потврђена и на основу мерења вискозитета, при чему се вискозитет раствора СТ-DNA благо повећања са порастом концентрације додатог комплекса.
- Испитивани мононуклеарни комплекси платине(II) показују добар афинитет за везивање за говеђи серум албумин (BSA).
- На испитиваним линијама туморских ћелија, новосинтетисани комплекси платине(II) показују дозно зависну цитотоксичност и јачу селективност према туморским ћелијама у односу на мезенхималне матичне ћелије, у поређењу са цисплатином и карбоплатином.
- Pt3 комплекс повећава проценат ћелија карцинома дојке и колона у раној и касној апоптози.
- Pt3 комплекс смањује експресију антиапоптотских молекула Bcl-2 и BclXL и повећава експресију каспазе-3 у испитиваним линијама туморских ћелија.
- Pt3 комплекс инхибира пролиферацију и миграцију туморских ћелија.
- Pt3 комплекс успорава раст примарног тумора дојке и значајно мање је токсичан, *in vivo*, у односу на цисплатину.



Фигура 35: Схематски приказ ефеката новосинтетисаног Pt3 комплекса на туморске ћелије

7 ЛИТЕРАТУРА

1. Kanjuh V. Opšta patologija tumora. Beograd: Medicinski podmladak; 1982.
2. Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am J Pathol.* 2008;173(2):301-10.
3. Pavel M, Renna M, Park SJ, Menzies FM, Ricketts T, Füllgrabe J, et al. Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nat Commun.* 2018;9(1):2961.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
5. Pistrutto G, Trisciuoglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-19.
6. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 2016;8(1):69.
7. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):211-8.
8. Bielenberg DR, Zetter BR. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J.* 2015;21(4):267-73.
9. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(9):1745-70.
10. Elgundi Z, Papanicolaou M, Major G, Cox TR, Melrose J, Whitelock JM, et al. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. *Front Oncol.* 2019;9:1482.
11. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol.* 2016;59(4):651-72.
12. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374-403.
13. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet.* 2011;378(9801):1461-84.
14. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:151-64.
15. Francies FZ, Hull R, Khanyile R, Dlamini Z. Breast cancer in low-middle income countries: abnormality in splicing and lack of targeted treatment options. *Am J Cancer Res.* 2020;10(5):1568-91.
16. Dafni U, Tsourti Z, Alatsathianos I. Breast Cancer Statistics in the European Union: Incidence and Survival across European Countries. *Breast Care (Basel).* 2019;14(6):344-53.
17. Lei S, Zheng R, Zhang S, Wang S, Chen R, Sun K, et al. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. *Cancer Commun (Lond).* 2021;41(11):1183-94.
18. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, Cabanes A, Caleffi M, Dunstan Yataco JA, et al. Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. *Cancer.* 2020;126 Suppl 10(Suppl 10):2379-93.
19. Unger-Saldaña K. Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):465-77.

20. Barrios CH. Global challenges in breast cancer detection and treatment. *Breast*. 2022;62 Suppl 1:S3-s6.
21. Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin*. 2018;13(3):339-54.
22. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387-97.
23. Dragan M. Incidencija i mortalitet raka u centralnoj Srbiji. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Beograd: Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr. Milan Jovanović - Batut“; 2014.
24. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(5):378-97.
25. Khodarahmi M, Azadbakht L. The association between different kinds of fat intake and breast cancer risk in women. *Int J Prev Med*. 2014;5(1):6-15.
26. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Womens Health (Lond)*. 2015;11(1):65-77.
27. Al-Sader H, Abdul-Jabar H, Allawi Z, Haba Y. Alcohol and breast cancer: the mechanisms explained. *J Clin Med Res*. 2009;1(3):125-31.
28. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res*. 2005;7(1):21-32.
29. Offersen BV, Overgaard J. Breast cancer radiation therapy. *Lancet*. 2020;396(10262):1558.
30. Davis JD, Lin SY. DNA damage and breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2011;2(9):329-38.
31. Ota I, Sakurai A, Toyoda Y, Morita S, Sasaki T, Chishima T, et al. Association between breast cancer risk and the wild-type allele of human ABC transporter ABCC11. *Anticancer Res*. 2010;30(12):5189-94.
32. Sheikh A, Hussain SA, Ghorri Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(6):2177-85.
33. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-220.
34. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8:23-31.
35. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010;4(3):192-208.
36. Džodić R. Hirurgija raka dojke. Beograd: Dosije; 2005.
37. Rummel S, Hueman MT, Costantino N, Shriver CD, Ellsworth RE. Tumour location within the breast: Does tumour site have prognostic ability? *Ecancermedalscience*. 2015;9:552.
38. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010;1(2):109-26.
39. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*. 2017;50(1):33.
40. Badve SS, Gökmen-Polar Y. Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019. *Pathology*. 2019;51(6):563-9.
41. Wen HY, Brogi E. Lobular Carcinoma In Situ. *Surg Pathol Clin*. 2018;11(1):123-45.
42. Shea EKH, Koh VCY, Tan PH. Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathol Int*. 2020;70(5):242-52.

43. Marques-Costa JC, Cuzzi T, Carneiro S, Parish LC, Ramos-e-Silva M. Paget's disease of the breast. *Skinmed*. 2012;10(3):160-5; quiz 5.
44. Jenkins S, Kachur ME, Rechache K, Wells JM, Lipkowitz S. Rare Breast Cancer Subtypes. *Curr Oncol Rep*. 2021;23(5):54.
45. Scholl AR, Flanagan MB. Educational Case: Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Acad Pathol*. 2020;7:2374289519897390.
46. van Steenhoven JEC, Kuijter A, Kornegoor R, van Leeuwen G, van Gorp J, van Dalen T, et al. Assessment of tumour proliferation by use of the mitotic activity index, and Ki67 and phosphohistone H3 expression, in early-stage luminal breast cancer. *Histopathology*. 2020;77(4):579-87.
47. Rahman M, Mohammed S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system. *Oncol Lett*. 2015;10(3):1233-9.
48. Thomas M, Kelly ED, Abraham J, Kruse M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Semin Oncol*. 2019;46(2):121-32.
49. Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*. 2020;112(1):25-41.
50. Menta A, Fouad TM, Lucci A, Le-Petross H, Stauder MC, Woodward WA, et al. Inflammatory Breast Cancer: What to Know About This Unique, Aggressive Breast Cancer. *Surg Clin North Am*. 2018;98(4):787-800.
51. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412-24.
52. Mirtavoos-Mahyari H, Khosravi A, Esfahani-Monfared Z. Human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen receptor status in respect to tumor characteristics in non-metastatic breast cancer. *Tanaffos*. 2014;13(1):26-34.
53. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(2):247-69.
54. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281-94.
55. Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018;38:457-67.
56. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*. 2018;472(5):697-703.
57. Loud JT, Murphy J. Cancer Screening and Early Detection in the 21(st) Century. *Semin Oncol Nurs*. 2017;33(2):121-8.
58. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*. 2013;183(4):1113-24.
59. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*. 2015;11(2):59-66.
60. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Breast Cancer: A Molecularly Heterogenous Disease Needing Subtype-Specific Treatments. *Med Sci (Basel)*. 2020;8(1).
61. Toft DJ, Cryns VL. Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Mol Endocrinol*. 2011;25(2):199-211.
62. Rädler PD, Wehde BL, Triplett AA, Shrestha H, Shepherd JH, Pfefferle AD, et al. Highly metastatic claudin-low mammary cancers can originate from luminal epithelial cells. *Nat Commun*. 2021;12(1):3742.
63. Zhao S, Ma D, Xiao Y, Li XM, Ma JL, Zhang H, et al. Molecular Subtyping of Triple-Negative Breast Cancers by Immunohistochemistry: Molecular Basis and Clinical Relevance. *Oncologist*. 2020;25(10):e1481-e91.

64. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(2):539-52.
65. Phung MT, Tin Tin S, Elwood JM. Prognostic models for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer.* 2019;19(1):230.
66. Tonello F, Bergmann A, de Souza Abrahão K, de Aguiar SS, Bello MA, Thuler LCS. Impact of Number of Positive Lymph Nodes and Lymph Node Ratio on Survival of Women with Node-Positive Breast Cancer. *Eur J Breast Health.* 2019;15(2):76-84.
67. Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(8):1048-52.
68. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):207.
69. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology.* 2010;17(4):229-51.
70. van Netten JP, Cann SH, Thornton IG, Finegan RP. The lymphatics in infiltrating ductal carcinoma (IDC) of the breast. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:97.
71. Coste A, Karagiannis GS, Wang Y, Xue EA, Lin Y, Skobe M, et al. Hematogenous Dissemination of Breast Cancer Cells From Lymph Nodes Is Mediated by Tumor MicroEnvironment of Metastasis Doorways. *Front Oncol.* 2020;10:571100.
72. He Z, Chen Z, Tan M, Elingarami S, Liu Y, Li T, et al. A review on methods for diagnosis of breast cancer cells and tissues. *Cell Prolif.* 2020;53(7):e12822.
73. Zeeshan M, Salam B, Khalid QSB, Alam S, Sayani R. Diagnostic Accuracy of Digital Mammography in the Detection of Breast Cancer. *Cureus.* 2018;10(4):e2448.
74. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R6.
75. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(3):309-30.
76. Stankov A, Bargallo-Rocha JE, Silvio A, Ramirez MT, Stankova-Ninova K, Meneses-Garcia A. Prognostic factors and recurrence in breast cancer: experience at the national cancer institute of Mexico. *ISRN Oncol.* 2012;2012:825258.
77. Zhang BN, Cao XC, Chen JY, Chen J, Fu L, Hu XC, et al. Guidelines on the diagnosis and treatment of breast cancer (2011 edition). *Gland Surg.* 2012;1(1):39-61.
78. Arendt LM, Kuperwasser C. Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015;20(1-2):9-25.
79. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014;2014:852748.
80. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):55-62.
81. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release.* 2010;146(3):264-75.
82. Joensuu K, Leidenius M, Kero M, Andersson LC, Horwitz KB, Heikkilä P. ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early and Late Relapsing Breast Cancer-Reduced CK5 Expression in Metastases. *Breast Cancer (Auckl).* 2013;7:23-34.

83. Mrozkowiak A, Olszewski WP, Piaścik A, Olszewski WT. HER2 status in breast cancer determined by IHC and FISH: comparison of the results. *Pol J Pathol.* 2004;55(4):165-71.
84. Rosa FE, Santos RM, Rogatto SR, Domingues MA. Chromogenic in situ hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/neu status in breast carcinomas. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(3):207-16.
85. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910-9.
86. Alberts B JA, Lewis J, et al. *Isolating Cells and Growing Them in Culture. Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
87. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis.* 2012;2(1):1-5.
88. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW, Jr. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(5):351-60.
89. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 20:Unit 20.2.
90. Iorns E, Drews-Elger K, Ward TM, Dean S, Clarke J, Berry D, et al. A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47995.
91. Zeng L, Li W, Chen CS. Breast cancer animal models and applications. *Zool Res.* 2020;41(5):477-94.
92. Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):212.
93. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:228.
94. Gregório AC, Fonseca NA, Moura V, Lacerda M, Figueiredo P, Simões S, et al. Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165817.
95. Schrörs B, Boegel S, Albrecht C, Bukur T, Bukur V, Holtsträter C, et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front Oncol.* 2020;10:1195.
96. Riis M. Modern surgical treatment of breast cancer. *Ann Med Surg (Lond).* 2020;56:95-107.
97. Kaufman CS. Increasing Role of Oncoplastic Surgery for Breast Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2019;21(12):111.
98. Jones C, Lancaster R. Evolution of Operative Technique for Mastectomy. *Surg Clin North Am.* 2018;98(4):835-44.
99. Riedel F, Hennigs A, Hug S, Schaeffgen B, Sohn C, Schuetz F, et al. Is Mastectomy Oncologically Safer than Breast-Conserving Treatment in Early Breast Cancer? *Breast Care (Basel).* 2017;12(6):385-90.
100. Valente SA, Shah C. The Landmark Series: Adjuvant Radiation Therapy for Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2020;27(7):2203-11.
101. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol.* 2018;9:1300.
102. Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucur).* 2017;112(4):413-7.
103. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel).* 2011;3(3):3279-330.

104. Arkin M, Moasser MM. HER-2-directed, small-molecule antagonists. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9(12):1264-76.
105. Lebert JM, Lester R, Powell E, Seal M, McCarthy J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol*. 2018;25(Suppl 1):S142-s50.
106. Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalsecience*. 2019;13:961.
107. Moen EK, Ibey BL, Beier HT, Armani AM. Quantifying pulsed electric field-induced membrane nanoporation in single cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(11):2795-803.
108. Deipolyi AR, Golberg A, Yarmush ML, Arellano RS, Oklu R. Irreversible electroporation: evolution of a laboratory technique in interventional oncology. *Diagn Interv Radiol*. 2014;20(2):147-54.
109. Szlasa W, Kiełbik A, Szewczyk A, Rembiałkowska N, Novickij V, Tarek M, et al. Oxidative Effects during Irreversible Electroporation of Melanoma Cells-In Vitro Study. *Molecules*. 2020;26(1).
110. Tsang SH, Ma KW, She WH, Chu F, Lau V, Lam SW, et al. High-intensity focused ultrasound ablation of liver tumors in difficult locations. *Int J Hyperthermia*. 2021;38(2):56-64.
111. Cvetković DM, Živanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, et al. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochemistry*. 2016.
112. Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggermann P. Electrochemotherapy as a New Modality in Interventional Oncology: A Review. *Technol Cancer Res Treat*. 2018;17:1533033818785329.
113. Muratori C, Pakhomov AG, Heller L, Casciola M, Gianulis E, Grigoryev S, et al. Electrosensitization Increases Antitumor Effectiveness of Nanosecond Pulsed Electric Fields In Vivo. *Technol Cancer Res Treat*. 2017;16(6):987-96.
114. Miklavčič D, Serša G, Breclj E, Gehl J, Soden D, Bianchi G, et al. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Med Biol Eng Comput*. 2012;50(12):1213-25.
115. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103.
116. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
117. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer*. 2011;128(7):1668-75.
118. Augustus GJ, Ellis NA. Colorectal Cancer Disparity in African Americans: Risk Factors and Carcinogenic Mechanisms. *Am J Pathol*. 2018;188(2):291-303.
119. Ilic M, Ilic I. Cancer mortality in Serbia, 1991-2015: an age-period-cohort and joinpoint regression analysis. *Cancer Commun (Lond)*. 2018;38(1):10.
120. Yang J, Yu J. The association of diet, gut microbiota and colorectal cancer: what we eat may imply what we get. *Protein Cell*. 2018;9(5):474-87.
121. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett*. 2010;293(2):133-43.
122. Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2014;10(1):45-54.
123. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;22(4):191-7.

124. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2008;37(1):1-24, v.
125. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15065.
126. John SK, George S, Primrose JN, Fozard JB. Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2011;13(1):17-25.
127. van den Berg I, Coebergh van den Braak RRJ, van Vugt JLA, Ijzermans JNM, Buettner S. Actual survival after resection of primary colorectal cancer: results from a prospective multicenter study. *World J Surg Oncol.* 2021;19(1):96.
128. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel).* 2018;6(2).
129. Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(29):9872-81.
130. Koveitypour Z, Panahi F, Vakilian M, Peymani M, Seyed Forootan F, Nasr Esfahani MH, et al. Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell Biosci.* 2019;9:97.
131. Alsheredah N, Akhtar S. Diet, obesity and colorectal carcinoma risk: results from a national cancer registry-based middle-eastern study. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1227.
132. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
133. Kolligs FT. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visc Med.* 2016;32(3):158-64.
134. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep.* 2015;34(3):1087-96.
135. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol.* 2013;43(4):973-84.
136. Bevan R, Rutter MD. Colorectal Cancer Screening-Who, How, and When? *Clin Endosc.* 2018;51(1):37-49.
137. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2001;33(4):372-88.
138. Loke YL, Chew MT, Ngeow YF, Lim WWD, Peh SC. Colon Carcinogenesis: The Interplay Between Diet and Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:603086.
139. Lee SJ, Yun CC. Colorectal cancer cells - Proliferation, survival and invasion by lysophosphatidic acid. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(12):1907-10.
140. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
141. Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J Gastroenterol.* 2015;21(41):11767-76.
142. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet.* 2019;394(10207):1467-80.
143. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007;50(1):113-30.
144. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2044-58.
145. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1177-90.e3.

146. Eshghifar N, Farrokhi N, Naji T, Zali M. Tumor suppressor genes in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2017;10(1):3-13.
147. Jia X, Shanmugam C, Paluri RK, Jhala NC, Behring MP, Katkoori VR, et al. Prognostic value of loss of heterozygosity and sub-cellular localization of SMAD4 varies with tumor stage in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(12):20198-212.
148. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2019;13(2):109-31.
149. Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(3):32-8.
150. Biller LH, Syngal S, Yurgelun MB. Recent advances in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2019;18(2):211-9.
151. Mitchem JB, Hall JF. Adenomatous Polyposis Syndromes: Diagnosis and Management. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016;29(4):321-9.
152. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(2):223-62; quiz 63.
153. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett*. 2018;16(1):9-18.
154. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020;158(2):291-302.
155. Dinarvand P, Davaro EP, Doan JV, Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, et al. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(11):1382-98.
156. Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocaña T, Balaguer F. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet*. 2015;8:95-107.
157. Stanich PP, Pearlman R. Hereditary or Not? Understanding Serrated Polyposis Syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2019;17(4):692-701.
158. Del Giudice ME, Vella ET, Hey A, Simunovic M, Harris W, Levitt C. Systematic review of clinical features of suspected colorectal cancer in primary care. *Can Fam Physician*. 2014;60(8):e405-15.
159. Burnett-Hartman AN, Lee JK, Demb J, Gupta S. An Update on the Epidemiology, Molecular Characterization, Diagnosis, and Screening Strategies for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2021;160(4):1041-9.
160. Qaseem A, Crandall CJ, Mustafa RA, Hicks LA, Wilt TJ, Forciea MA, et al. Screening for Colorectal Cancer in Asymptomatic Average-Risk Adults: A Guidance Statement From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2019;171(9):643-54.
161. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-73.
162. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Res*. 2018;11(4):264-73.
163. Koelzer VH, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol*. 2014;4:29.
164. Luo C, Cen S, Ding G, Wu W. Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. *Cancer Commun (Lond)*. 2019;39(1):13.
165. Kanthan R, Tharmaradinam S, Asif T, Ahmed S, Kanthan SC. Mixed epithelial endocrine neoplasms of the colon and rectum - An evolution over time: A systematic review. *World J Gastroenterol*. 2020;26(34):5181-206.

166. Khan S, Haider G, Abid Z, Bukhari N, Khan SZ, Abid M. Adequacy of Surgical Pathology Reports of Colorectal Carcinoma and Its Significance. *Cureus*. 2021;13(8):e16965.
167. Huang A, Yang Y, Shi JY, Li YK, Xu JX, Cheng Y, et al. Mucinous adenocarcinoma: A unique clinicopathological subtype in colorectal cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2021;13(12):1567-83.
168. Maeda Y, Sadahiro S, Suzuki T, Haruki Y, Nakamura N. Significance of the mucinous component in the histopathological classification of colon cancer. *Surg Today*. 2016;46(3):303-8.
169. Nitsche U, Zimmermann A, Späth C, Müller T, Maak M, Schuster T, et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann Surg*. 2013;258(5):775-82; discussion 82-3.
170. Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2767-810.
171. Cunningham J, Kantekure K, Saif MW. Medullary carcinoma of the colon: a case series and review of the literature. *In Vivo*. 2014;28(3):311-4.
172. Lee LH, Yantiss RK, Sadot E, Ren B, Calvacanti MS, Hechtman JF, et al. Diagnosing colorectal medullary carcinoma: interobserver variability and clinicopathological implications. *Hum Pathol*. 2017;62:74-82.
173. Ong ML, Schofield JB. Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2016;8(3):179-92.
174. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2016;6:29765.
175. Hugen N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol*. 2014;25(3):651-7.
176. Lynch ML, Brand MI. Preoperative evaluation and oncologic principles of colon cancer surgery. *Clin Colon Rectal Surg*. 2005;18(3):163-73.
177. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
178. Akkoca AN, Yanık S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2828-35.
179. Arena EA, Bilchik AJ. What is the optimal means of staging colon cancer? *Adv Surg*. 2013;47:199-211.
180. Coll AR. Dukes' staging is poorly understood by doctors managing colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl*. 2003;85(6):444.
181. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Ishiguro M, Kajiwara Y, Sato T, et al. Histological grading of colorectal cancer: a simple and objective method. *Ann Surg*. 2008;247(5):811-8.
182. Ji MY, Yuan L, Lu SM, Gao MT, Zeng Z, Zhan N, et al. Glandular orientation and shape determined by computational pathology could identify aggressive tumor for early colon carcinoma: a triple-center study. *J Transl Med*. 2020;18(1):129.
183. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-8.
184. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer*. 2017;84:69-80.
185. Alexiusdottir KK, Möller PH, Snaebjornsson P, Jonasson L, Olafsdottir EJ, Björnsson ES, et al. Association of symptoms of colon cancer patients with tumor location and TNM tumor stage. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47(7):795-801.

186. Kuo YH, Shi CS, Huang CY, Huang YC, Chin CC. Prognostic significance of unintentional body weight loss in colon cancer patients. *Mol Clin Oncol*. 2018;8(4):533-8.
187. Ioannou GN, Rockey DC, Bryson CL, Weiss NS. Iron deficiency and gastrointestinal malignancy: a population-based cohort study. *Am J Med*. 2002;113(4):276-80.
188. Jönsson PE, Bengtsson G, Carlsson G, Jonson G, Tryding N. Value of serum-5-nucleotidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase for prediction of liver metastases preoperatively in colorectal cancer. *Acta Chir Scand*. 1984;150(5):419-23.
189. Wu XZ, Ma F, Wang XL. Serological diagnostic factors for liver metastasis in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2010;16(32):4084-8.
190. Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg*. 2016;7(1):17-20.
191. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016;22(5):1745-55.
192. Hall C, Clarke L, Pal A, Buchwald P, Eglinton T, Wakeman C, et al. A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. *Ann Coloproctol*. 2019;35(6):294-305.
193. Lee T, Teng TZJ, Shelat VG. Carbohydrate antigen 19-9 - tumor marker: Past, present, and future. *World J Gastrointest Surg*. 2020;12(12):468-90.
194. Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, Ch'ng SL, Hammond E, Hayes DF, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clin Chem*. 2008;54(8):e1-e10.
195. Meng C, Yin X, Liu J, Tang K, Tang H, Liao J. TIMP-1 is a novel serum biomarker for the diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207039.
196. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2009;30(1):1-8.
197. Triantafyllou K, Beintaris I, Dimitriadis GD. Is there a role for colon capsule endoscopy beyond colorectal cancer screening? A literature review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):13006-14.
198. Canon CL. Is there still a role for double-contrast barium enema examination? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(4):389-92.
199. Kinkel K, Lu Y, Both M, Warren RS, Thoeni RF. Detection of hepatic metastases from cancers of the gastrointestinal tract by using noninvasive imaging methods (US, CT, MR imaging, PET): a meta-analysis. *Radiology*. 2002;224(3):748-56.
200. Xu JF, Yang L, Jin P, Sheng JQ. Endoscopic Approach for Superficial Colorectal Neoplasms. *Gastrointest Tumors*. 2016;3(2):69-80.
201. Zhang W, Song ZJ, Zhang BY, Wang JL, Guo Q, Sun ZW, et al. Multiplex immunohistochemistry indicates biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma*. 2021;68(6):1272-82.
202. Mirhosseini S, Gutenko I, Ojal S, Marino J, Kaufman A. Immersive Virtual Colonoscopy. *IEEE Trans Vis Comput Graph*. 2019;25(5):2011-21.
203. Ebner DW, Kisiel JB. Stool-Based Tests for Colorectal Cancer Screening: Performance Benchmarks Lead to High Expected Efficacy. *Curr Gastroenterol Rep*. 2020;22(7):32.
204. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, et al. APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg*. 2005;71(4):336-43.
205. Lim SB, Jeong SY, Kim IJ, Kim DY, Jung KH, Chang HJ, et al. Analysis of microsatellite instability in stool DNA of patients with colorectal cancer using denaturing high performance liquid chromatography. *World J Gastroenterol*. 2006;12(41):6689-92.

206. Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*. 2008;3(11):e3759.
207. Kai K, Nagano O, Sugihara E, Arima Y, Sampetean O, Ishimoto T, et al. Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Sci*. 2009;100(12):2275-82.
208. Ieda T, Tazawa H, Okabayashi H, Yano S, Shigeyasu K, Kuroda S, et al. Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment-colorectal cancer network. *Sci Rep*. 2019;9(1):16378.
209. Schulte Am Esch JSA, Windmüller BA, Hanewinkel J, Storm J, Förster C, Wilkens L, et al. Isolation and Characterization of Two Novel Colorectal Cancer Cell Lines, Containing a Subpopulation with Potential Stem-Like Properties: Treatment Options by MYC/NMYC Inhibition. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9).
210. Bürtin F, Mullins CS, Linnebacher M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2020;26(13):1394-426.
211. Tseng W, Leong X, Engleman E. Orthotopic mouse model of colorectal cancer. *J Vis Exp*. 2007(10):484.
212. Mittal VK, Bhullar JS, Jayant K. Animal models of human colorectal cancer: Current status, uses and limitations. *World J Gastroenterol*. 2015;21(41):11854-61.
213. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv22-iv40.
214. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 5:v70-7.
215. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020;31(10):1291-305.
216. Sievers CK, Kratz JD, Zurbriggen LD, LoConte NK, Lubner SJ, Uboha N, et al. The Multidisciplinary Management of Colorectal Cancer: Present and Future Paradigms. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016;29(3):232-8.
217. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479-516.
218. Xynos E, Gouvas N, Triantopoulou C, Tekkis P, Vini L, Tzardi M, et al. Clinical practice guidelines for the surgical management of colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol*. 2016;29(1):3-17.
219. Fischer U, Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 1:942-61.
220. Petrelli F, Zaniboni A, Ghidini A, Ghidini M, Turati L, Pizzo C, et al. Timing of Adjuvant Chemotherapy and Survival in Colorectal, Gastric, and Pancreatic Cancer. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
221. Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, Androulakis N, Athanasiadis A, Boukovinas I, et al. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol*. 2016;29(1):18-23.
222. Taieb J, Gallois C. Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9).

223. Lee Y, Park I, Cho H, Gwak G, Yang K, Bae BN. Effect of Adjuvant Chemotherapy on Elderly Stage II High-Risk Colorectal Cancer Patients. *Ann Coloproctol.* 2021;37(5):298-305.
224. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1465-71.
225. Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, Kong W, King WD, Booth CM. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2011;305(22):2335-42.
226. O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, Gangnon RE, Liou JI, Heise CP, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. *J Clin Oncol.* 2011;29(25):3381-8.
227. Glynne-Jones R, Chau I. Neoadjuvant therapy before surgical treatment. *EJC Suppl.* 2013;11(2):45-59.
228. Riddell IA. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci.* 2018;18.
229. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
230. Mehmood RK. Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncol Rev.* 2014;8(2):256.
231. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):148-58.
232. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:599-616.
233. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010;39(35):8113-27.
234. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77(6):1103-24.
235. Boal AK, Rosenzweig AC. Crystal structures of cisplatin bound to a human copper chaperone. *J Am Chem Soc.* 2009;131(40):14196-7.
236. Tsvetkova D, Ivanova S. Application of Approved Cisplatin Derivatives in Combination Therapy against Different Cancer Diseases. *Molecules.* 2022;27(8).
237. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther.* 2019;11(4).
238. Martinho N, Santos TCB, Florindo HF, Silva LC. Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity. *Front Physiol.* 2018;9:1898.
239. Hou XM, Zhang XH, Wei KJ, Ji C, Dou SX, Wang WC, et al. Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(5):1400-10.
240. Mapuskar KA, Steinbach EJ, Zaher A, Riley DP, Beardsley RA, Keene JL, et al. Mitochondrial Superoxide Dismutase in Cisplatin-Induced Kidney Injury. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(9).
241. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-71.
242. Volarevic V, Djokovic B, Jankovic MG, Harrell CR, Fellabaum C, Djonov V, et al. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):25.
243. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):515-23.

244. Paken J, Govender CD, Pillay M, Sewram V. Cisplatin-Associated Ototoxicity: A Review for the Health Professional. *J Toxicol.* 2016;2016:1809394.
245. Calls A, Torres-Espin A, Navarro X, Yuste VJ, Udina E, Bruna J. Cisplatin-induced peripheral neuropathy is associated with neuronal senescence-like response. *Neuro Oncol.* 2021;23(1):88-99.
246. Hakeam HA, Arab A, Azzam A, Alyahya Z, Eldali AM, Amin T. Incidence of leukopenia and thrombocytopenia with cisplatin plus mitomycin-c versus melphalan in patients undergoing cytoreductive surgery (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;81(4):697-704.
247. Trendowski MR, El Charif O, Dinh PC, Jr., Travis LB, Dolan ME. Genetic and Modifiable Risk Factors Contributing to Cisplatin-induced Toxicities. *Clin Cancer Res.* 2019;25(4):1147-55.
248. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2010;2(11):2490-518.
249. Filipski KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH, Sparreboom A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(4):396-402.
250. Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, et al. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press.* 2014;12(2):55-65.
251. Fu Y, Cai J, Li F, Liu Z, Shu S, Wang Y, et al. Chronic effects of repeated low-dose cisplatin treatment in mouse kidneys and renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019;317(6):F1582-f92.
252. Abd Rashid N, Abd Halim SAS, Teoh SL, Budin SB, Hussan F, Adib Ridzuan NR, et al. The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2021;144:112328.
253. McSweeney KR, Gadanec LK, Qaradakhi T, Ali BA, Zulli A, Apostolopoulos V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations. *Cancers (Basel).* 2021;13(7).
254. Ognjanović BI, Djordjević NZ, Matić MM, Obradović JM, Mladenović JM, Stajn A, et al. Lipid peroxidative damage on Cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1790-803.
255. Almaghrabi OA. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22(2):227-31.
256. Chirino YI, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol.* 2004;4:20.
257. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(3):119-46.
258. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
259. Nanji AA, Stewart DJ, Mikhael NZ. Hyperuricemia and hypoalbuminemia predispose to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;17(3):274-6.
260. Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol.* 2008;28(3):337-44.

261. Shahid F, Farooqui Z, Khan F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *Eur J Pharmacol.* 2018;827:49-57.
262. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;532(3):290-3.
263. El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):466-73.
264. Paken J, Govender CD, Pillay M, Sewram V. A Review of Cisplatin-Associated Ototoxicity. *Semin Hear.* 2019;40(2):108-21.
265. Sheth S, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Otoprotection. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:338.
266. Ma W, Wei S, Zhang B, Li W. Molecular Mechanisms of Cardiomyocyte Death in Drug-Induced Cardiotoxicity. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:434.
267. Hu Y, Sun B, Zhao B, Mei D, Gu Q, Tian Z. Cisplatin-induced cardiotoxicity with midrange ejection fraction: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(52):e13807.
268. Lee YG, Lee E, Kim I, Lee KW, Kim TM, Lee SH, et al. Cisplatin-Based Chemotherapy Is a Strong Risk Factor for Thromboembolic Events in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Res Treat.* 2015;47(4):670-5.
269. Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology.* 2016;371:58-66.
270. Michel L, Rassaf T, Totzeck M. Biomarkers for the detection of apparent and subclinical cancer therapy-related cardiotoxicity. *J Thorac Dis.* 2018;10(Suppl 35):S4282-s95.
271. Fassas A, Gojo I, Rapoport A, Cottler-Fox M, Meisenberg B, Papadimitriou JC, et al. Pulmonary toxicity syndrome following CDEP (cyclophosphamide, dexamethasone, etoposide, cisplatin) chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(4):399-403.
272. Starobova H, Vetter I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:174.
273. Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev.* 2006;2(3):271-9.
274. Benoit L, Mir O, Vialard F, Berveiller P. Cancer during Pregnancy: A Review of Preclinical and Clinical Transplacental Transfer of Anticancer Agents. *Cancers (Basel).* 2021;13(6).
275. Reed E, Evans MK. Acute leukemia following cisplatin-based chemotherapy in a patient with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(5):431-2.
276. Dertinger SD, Avlasevich SL, Torous DK, Bemis JC, Phonethepswath S, Labash C, et al. Persistence of cisplatin-induced mutagenicity in hematopoietic stem cells: implications for secondary cancer risk following chemotherapy. *Toxicol Sci.* 2014;140(2):307-14.
277. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E, et al. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation. *Oncol Rep.* 2013;29(4):1285-92.
278. Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf.* 2009;32(12):1109-22.
279. Brouwers EE, Huitema AD, Beijnen JH, Schellens JH. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clin Pharmacol.* 2008;8:7.

280. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev.* 2016;116(5):3436-86.
281. Vermorken JB, ten Bokkel Huinink WW, Eisenhauer EA, Favalli G, Belpomme D, Conte PF, et al. Advanced ovarian cancer. Carboplatin versus cisplatin. *Ann Oncol.* 1993;4 Suppl 4:41-8.
282. Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol.* 1998;9(1):13-21.
283. Fox LE. Carboplatin. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;36(1):13-4.
284. Zhou NN, Zhao YY, Zhai LZ, Ruan CM, Yang YP, Huang Y, et al. The Efficacy and Toxicity of Lobaplatin-contained Chemotherapy in Extensive-stage Small-cell Lung Cancer. *J Cancer.* 2018;9(13):2232-6.
285. Wu Y, Xu XY, Yan F, Sun WL, Zhang Y, Liu DL, et al. Retrospective study of the efficacy and toxicity of lobaplatin in combined chemotherapy for metastatic breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4849-57.
286. Kuwahara A, Yamamori M, Nishiguchi K, Okuno T, Chayahara N, Miki I, et al. Replacement of cisplatin with nedaplatin in a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.* 2009;6(6):305-11.
287. Min YJ, Bang SJ, Shin JW, Kim DH, Park JH, Kim GY, et al. Combination chemotherapy with 5-fluorouracil and heptaplatin as first-line treatment in patients with advanced gastric cancer. *J Korean Med Sci.* 2004;19(3):369-73.
288. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-21.
289. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol.* 1998;9(10):1053-71.
290. Karabacak K, Kadan M, Kaya E, Durgun B, Arslan G, Doganci S, et al. Oxaliplatin Induced Digital Ischemia and Necrosis. *Case Rep Vasc Med.* 2015;2015:248748.
291. Vietor NO, George BJ. Oxaliplatin-induced hepatocellular injury and ototoxicity: a review of the literature and report of unusual side effects of a commonly used chemotherapeutic agent. *J Oncol Pharm Pract.* 2012;18(3):355-9.
292. Harvey MA, Suarez S, Baggio R. Three phenanthroline-metal complexes with topologically similar but geometrically different conformations. *Acta Crystallogr E Crystallogr Commun.* 2016;72(Pt 11):1581-6.
293. Bencini A, Lippolis V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coordination Chemistry Reviews.* 2010;254(17):2096-180.
294. Shee NK, Das D, Oluwafunmilayo Adekunle FA, Drew MGB, Datta D. Homoleptic copper(II) and copper(I) complexes of 5,6-dihydro-5,6-epoxy-1,10-phenanthroline. Six-coordinate copper(I) in solution. *Inorganica Chimica Acta.* 2011;366(1):198-202.
295. Terry TJ, Stack TDP. Covalent Heterogenization of a Discrete Mn(II) Bis-Phen Complex by a Metal-Template/Metal-Exchange Method: An Epoxidation Catalyst with Enhanced Reactivity. *Journal of the American Chemical Society.* 2008;130(14):4945-53.
296. Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol.* 2019;7(1):3-23.
297. Tian H, Ma D, Tan X, Yan W, Wu X, He C, et al. Platinum and Taxane Based Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer: A Narrative Review. *Front Pharmacol.* 2021;12:770663.

298. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(1):57-84.
299. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59(2):159-68.
300. Bitha P, Morton GO, Dunne TS, Delos Santos EF, Lin YI, Boone SR, et al. (Malonato)bis[sulfinylbis[methane]-S]platinum(II) compounds: versatile synthons for a new general synthesis of antitumor symmetrical and dissymmetrical (malonato)platinum(II) complexes. *Inorganic Chemistry*. 1990;29(4):645-52.
301. Price JH, Williamson AN, Schramm RF, Wayland BB. Palladium(II) and platinum(II) alkyl sulfoxide complexes. Examples of sulfur-bonded, mixed sulfur- and oxygen-bonded, and totally oxygen-bonded complexes. *Inorganic Chemistry*. 1972;11(6):1280-4.
302. Paschke R, Kalbitz J, Paetz C, Luckner M, Mueller T, Schmoll HJ, et al. Cholic acid-carboplatin compounds (CarboChAPt) as models for specific drug delivery: synthesis of novel carboplatin analogous derivatives and comparison of the cytotoxic properties with corresponding cisplatin compounds. *J Inorg Biochem*. 2003;94(4):335-42.
303. Dolomanov OV, Bourhis LJ, Gildea RJ, Howard JAK, Puschmann H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*. 2009;42(2):339-41.
304. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Shields GP, Taylor R, et al. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*. 2006;39(3):453-7.
305. Hertzberg RP, Dervan PB. Cleavage of double helical DNA by methidium-propyl-EDTA-iron(II). *Journal of the American Chemical Society*. 1982;104(1):313-5.
306. Chen J, Wang X, Shao Y, Zhu J, Zhu Y, Li Y, et al. A Trinuclear Copper(II) Complex of 2,4,6-Tris(di-2-pyridylamine)-1,3,5-triazine Shows Prominent DNA Cleavage Activity. *Inorganic Chemistry*. 2007;46(8):3306-12.
307. Jiao J, Jiang M, Li YT, Wu ZY, Yan CW. In vitro cytotoxic activities, DNA-, and BSA-binding studies of a new dinuclear copper(II) complex with N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-(2-carboxylatophenyl)-oxamide as ligand. *J Biochem Mol Toxicol*. 2014;28(2):47-59.
308. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, et al. The organic ester O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget*. 2018;9(46):28195-212.
309. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 2020;1(3):332-49.
310. Cormier N, Yeo A, Fiorentino E, Paxson J. Optimization of the Wound Scratch Assay to Detect Changes in Murine Mesenchymal Stromal Cell Migration After Damage by Soluble Cigarette Smoke Extract. *J Vis Exp*. 2015(106):e53414.
311. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1902-12.
312. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995;22(6):696-9.
313. Zeiss CJ, Gatti DM, Toro-Salazar O, Davis C, Lutz CM, Spinale F, et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Collaborative Cross (CC) Mice Recapitulates Individual Cardiotoxicity in Humans. *G3 (Bethesda)*. 2019;9(8):2637-46.
314. Saghir SAM, Al-Gabri NA, Khafaga AF, El-Shaer NH, Alhumaidh KA, Elsadek MF, et al. Thymoquinone-PLGA-PVA Nanoparticles Ameliorate Bleomycin-Induced Pulmonary

- Fibrosis in Rats via Regulation of Inflammatory Cytokines and iNOS Signaling. *Animals* (Basel). 2019;9(11).
315. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994;45:153-203.
316. Johansson JS. Binding of the volatile anesthetic chloroform to albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *J Biol Chem.* 1997;272(29):17961-5.
317. Wang Y, Zhang H, Zhang G, Tao W, Tang S. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Luminescence.* 2007;126:211-8.
318. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011;331(6024):1559-64.
319. Global battle against cancer won't be won with treatment alone--effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis. *Cent Eur J Public Health.* 2014;22(1):23, 8.
320. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Živković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer.* 2013;13:18.
321. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33.
322. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* 2018;47(19):6645-53.
323. Invernizzi C, Rovetta T, Licchelli M, Malagodi M. Mid and Near-Infrared Reflection Spectral Database of Natural Organic Materials in the Cultural Heritage Field. *International Journal of Analytical Chemistry.* 2018;2018:7823248.
324. Novakova O, Chen H, Vrana O, Rodger A, Sadler PJ, Brabec V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry.* 2003;42(39):11544-54.
325. Jovanović-Stević S, Radisavljević S, Scheurer A, Čočić D, Šmit B, Petković M, et al. Bis(triazinyl)pyridine complexes of Pt(II) and Pd(II): studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/HSA interactions, molecular docking and biological activity. *J Biol Inorg Chem.* 2021;26(5):625-37.
326. Wang Y-Q, Zhang H-M, Zhang G-C, Tao W-H, Tang S-H. Binding of brucine to human serum albumin. *Journal of Molecular Structure.* 2007;830(1):40-5.
327. Sun Y, Wei H, Zhang Q, Zhao X. Platinum(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Hydrophilic Alkoxyacetate Ligands as Potential Antitumor Agents. *Chem Biodivers.* 2019;16(1):e1800373.
328. Backman-Blanco G, Valdés H, Ramírez-Apan MT, Cano-Sanchez P, Hernandez-Ortega S, Orjuela AL, et al. Synthesis of Pt(II) complexes of the type [Pt(1,10-phenanthroline)(SArFn)₂] (SArFn = SC₆H₃-3,4-F₂; SC₆F₄-4-H; SC₆F₅). Preliminary evaluation of their in vitro anticancer activity. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2020;211:111206.
329. Krause-Heuer AM, Grünert R, Kühne S, Buczkowska M, Wheate NJ, Le Pevelen DD, et al. Studies of the Mechanism of Action of Platinum(II) Complexes with Potent Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2009;52(17):5474-84.
330. Marković N, Zarić M, Živković MD, Rajković S, Jovanović I, Arsenijević N, et al. Novel Platinum(II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells In Vitro. *ChemistrySelect.* 2019;4(44):12971-7.
331. Konovalov B, Živković MD, Milovanović JZ, Djordjević DB, Arsenijević AN, Vasić IR, et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum(ii) complexes with an aromatic 1,5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum(ii) complexes in relation to the complex structure. *Dalton Transactions.* 2018;47(42):15091-102.

332. Hadian Rasanani S, Eslami Moghadam M, Soleimani E, Divsalar A, Ajloo D, Tarlani A, et al. Anticancer activity of new imidazole derivative of 1R,2R-diaminocyclohexane palladium and platinum complexes as DNA fluorescent probes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2018;36(12):3058-76.
333. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):205-18.
334. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(1):33-43.
335. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541.
336. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
337. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ*. 2012;19(5):735-42.
338. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res*. 2020;9.
339. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(3):175-93.
340. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):952-61.
341. Janko C, Jeremic I, Biermann M, Chaurio R, Schorn C, Muñoz LE, et al. Cooperative binding of Annexin A5 to phosphatidylserine on apoptotic cell membranes. *Phys Biol*. 2013;10(6):065006.
342. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):821-46.
343. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
344. Metz GE, Galindo I, Abeyá MM, Echeverría MG, Alonso C. Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus Res*. 2016;213:219-23.
345. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *Faseb j*. 2009;23(6):1625-37.
346. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):42-50.
347. Lossi L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochem J*. 2022;479(3):357-84.
348. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*. 2013;87(7):1157-80.
349. Panganiban RA, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):15931-58.
350. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 2008;41(1):11-22.
351. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005;54(7):1024-33.
352. Backes CS, Friedmann KS, Mang S, Knörck A, Hoth M, Kummerow C. Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *J Biol Chem*. 2018;293(42):16348-63.
353. Sun Y, Wei H, Zhang Q, Zhao X. Platinum(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Hydrophilic Alkoxyacetate Ligands as Potential Antitumor Agents. *Chemistry & Biodiversity*. 2019;16(1):e1800373.

354. Qin QP, Chen ZF, Shen WY, Jiang YH, Cao D, Li YL, et al. Synthesis of a platinum(II) complex with 2-(4-methoxy-phenyl) imidazo [4,5-f]-[1,10] phenanthroline and study of its antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2015;89:77-87.
355. Qin QP, Wang SL, Tan MX, Wang ZF, Luo DM, Zou BQ, et al. Novel tacrine platinum(II) complexes display high anticancer activity via inhibition of telomerase activity, dysfunction of mitochondria, and activation of the p53 signaling pathway. *Eur J Med Chem.* 2018;158:106-22.
356. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008714.
357. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation.* 2018;25(1):65-80.
358. Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death & Differentiation.* 2000;7(12):1182-91.
359. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008;4(5):600-6.
360. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1(Suppl 1):S2-19.
361. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol.* 2012;2012:524308.
362. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2).
363. Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1071-80.
364. D'Aguzzo S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells.* 2020;9(5).
365. Yang QF, Sakurai T, Yoshimura G, Shan L, Suzuma T, Tamaki T, et al. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;61(3):211-6.
366. Davis JM, Navolanic PM, Weinstein-Oppenheimer CR, Steelman LS, Hu W, Konopleva M, et al. Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance. *Clin Cancer Res.* 2003;9(3):1161-70.
367. Del Bufalo D, Biroccio A, Trisciuglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A, et al. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur J Cancer.* 2002;38(18):2455-62.
368. Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995;55(17):3902-7.
369. Huang Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, et al. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;42(1):73-81.
370. Gao G, Dou QP. G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58(5):1001-10.
371. Knowlton K, Mancini M, Creason S, Morales C, Hockenbery D, Anderson BO. Bcl-2 slows in vitro breast cancer growth despite its antiapoptotic effect. *J Surg Res.* 1998;76(1):22-6.
372. Pheasant TJ, Myant KB, Cole AM, Ridgway RA, Pearson H, Muncan V, et al. Endogenous c-Myc is essential for p53-induced apoptosis in response to DNA damage in vivo. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):956-66.

373. Ha JH, Shin JS, Yoon MK, Lee MS, He F, Bae KH, et al. Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *J Biol Chem*. 2013;288(10):7387-98.
374. He K, Zheng X, Zhang L, Yu J. Hsp90 inhibitors promote p53-dependent apoptosis through PUMA and Bax. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(11):2559-68.
375. Takahashi M, Kakudo Y, Takahashi S, Sakamoto Y, Kato S, Ishioka C. Overexpression of DRAM enhances p53-dependent apoptosis. *Cancer Med*. 2013;2(1):1-10.
376. Olivos DJ, Mayo LD. Abstract 2241: MDM2 silencing promotes tumor-initiating cells in osteosarcoma and breast cancer. *Cancer Research*. 2015;75(15_Supplement):2241-.
377. Yilmaz I, Akar OR, Erkisa M, Selvi S, Şengül A, Ulukaya E. Highly Promising Antitumor Agent of a Novel Platinum(II) Complex Bearing a Tetradentate Chelating Ligand. *ACS Med Chem Lett*. 2020;11(5):940-8.
378. Bai X, Ali A, Lv Z, Wang N, Zhao X, Hao H, et al. Platinum complexes inhibit HER-2 enriched and triple-negative breast cancer cells metabolism to suppress growth, stemness and migration by targeting PKM/LDHA and CCND1/BCL2/ATG3 signaling pathways. *Eur J Med Chem*. 2021;224:113689.
379. Deng J, Wang J, Khan M, Yu P, Yang F, Liang H. Structure and biological properties of five Pt(II) complexes as potential anticancer agents. *J Inorg Biochem*. 2018;185:10-6.
380. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7320-6.
381. Krause-Heuer AM, Grünert R, Kühne S, Buczkowska M, Wheate NJ, Le Pevelen DD, et al. Studies of the mechanism of action of platinum(II) complexes with potent cytotoxicity in human cancer cells. *J Med Chem*. 2009;52(17):5474-84.
382. Fabijańska M, Studzian K, Szmigiero L, Rybarczyk-Pirek AJ, Pfitzner A, Cebula-Obrzut B, et al. trans-Platinum(II) complex of 3-aminoflavone - synthesis, X-ray crystal structure and biological activities in vitro. *Dalton Trans*. 2015;44(3):938-47.
383. Maji M, Acharya S, Maji S, Purkait K, Gupta A, Mukherjee A. Differences in Stability, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of Ru(II) and Pt(II) Complexes of a Bidentate N,O Donor Ligand. *Inorg Chem*. 2020;59(14):10262-74.
384. Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(12):1761-70.
385. Yim EK, Park JS. Biomarkers in cervical cancer. *Biomark Insights*. 2007;1:215-25.
386. Valenti G, Vitale SG, Tropea A, Biondi A, Laganà AS. Tumor markers of uterine cervical cancer: a new scenario to guide surgical practice? *Updates Surg*. 2017;69(4):441-9.
387. Kammerer-Jacquet SF, Ahmad A, Møller H, Sandu H, Scardino P, Soosay G, et al. Ki-67 is an independent predictor of prostate cancer death in routine needle biopsy samples: proving utility for routine assessments. *Mod Pathol*. 2019;32(9):1303-9.
388. Kanthiya K, Khunnarong J, Tangjitgamol S, Puripat N, Tanvanich S. Expression of the p16 and Ki67 in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3201-6.
389. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, et al. Expression of the p16 and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol*. 2008;19(3):162-8.
390. Kim K, Choi SC, Ryu SY, Kim JW, Kang SB. Major clinical research advances in gynecologic cancer 2008. *J Gynecol Oncol*. 2008;19(4):209-17.

391. Yu L, Chen X, Liu X, Fei L, Ma H, Tian T, et al. Significance of Triple Detection of p16/ki-67 Dual-Staining, Liquid-Based Cytology and HR HPV Testing in Screening of Cervical Cancer: A Retrospective Study. *Frontiers in Oncology*. 2022;12.
392. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med*. 2010;1(5):747-54.
393. Vasić I, Rajković S, Arsenijević A, Milovanović M, Arsenijević N, Milovanović J, et al. In vitro and in vivo activity of series of cationic dinuclearPt(II) complexes. *J Inorg Biochem*. 2021;225:111619.
394. Tong K-C, Wan P-K, Lok C-N, Che C-M. Dynamic supramolecular self-assembly of platinum(II) complexes perturbs an autophagy-lysosomal system and triggers cancer cell death. *Chemical Science*. 2021;12(46):15229-38.
395. Kurosaka S, Kashina A. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008;84(2):102-22.
396. Bai X, Ali A, Lv Z, Wang N, Zhao X, Hao H, et al. Platinum complexes inhibit HER-2 enriched and triple-negative breast cancer cells metabolism to suppress growth, stemness and migration by targeting PKM/LDHA and CCND1/BCL2/ATG3 signaling pathways. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;224:113689.
397. Wang FY, Tang XM, Wang X, Huang KB, Feng HW, Chen ZF, et al. Mitochondria-targeted platinum(II) complexes induce apoptosis-dependent autophagic cell death mediated by ER-stress in A549 cancer cells. *Eur J Med Chem*. 2018;155:639-50.
398. Ng NS, Wu MJ, Myers SJ, Aldrich-Wright JR. The in vitro renal cell toxicity of some unconventional anticancer phenanthroline-based platinum(II) complexes. *J Inorg Biochem*. 2018;179:97-106.
399. Marzano C, Bettio F, Baccichetti F, Trevisan A, Giovagnini L, Fregona D. Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. *Chem Biol Interact*. 2004;148(1-2):37-48.
400. Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J. Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(4):460-5.
401. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*. 2012;2012:645460.
402. Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2016;10:17-24.
403. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci*. 2019;226:156-63.
404. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2307-16.
405. Huang J, Pan H, Wang J, Wang T, Huo X, Ma Y, et al. Unfolded protein response in colorectal cancer. *Cell & Bioscience*. 2021;11(1):26.
406. Amin MN, Siddiqui SA, Ibrahim M, Hakim ML, Ahammed MS, Kabir A, et al. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease and cancer. *SAGE Open Med*. 2020;8:2050312120965752.
407. Biemmi V, Milano G, Ciullo A, Cervio E, Burrello J, Dei Cas M, et al. Inflammatory extracellular vesicles prompt heart dysfunction via TRL4-dependent NF-κB activation. *Theranostics*. 2020;10(6):2773-90.
408. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5732956.

409. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GY, Kehoe ST. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia*. 2002;4(6):465-73.
410. Licciardello JT, Moake JL, Rudy CK, Karp DD, Hong WK. Elevated plasma von Willebrand factor levels and arterial occlusive complications associated with cisplatin-based chemotherapy. *Oncology*. 1985;42(5):296-300.
411. Makimoto A, Matsui M, Chin M, Koh K, Tomotsune M, Kaneko T, et al. Magnesium supplementation therapy to prevent cisplatin-induced acute nephrotoxicity in pediatric cancer: A protocol for a randomized phase 2 trial. *Contemp Clin Trials Commun*. 2019;16:100440.
412. Cameron AC, Touyz RM, Lang NN. Vascular Complications of Cancer Chemotherapy. *Can J Cardiol*. 2016;32(7):852-62.
413. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res*. 2006;53(3):278-86.
414. Stelwagen J, Lubberts S, Stegink LC, Steursma G, Kruijff LM, Donkerbroek JW, et al. Vascular aging in long-term survivors of testicular cancer more than 20 years after treatment with cisplatin-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 2020;123(11):1599-607.
415. Bachmeyer C, Joly H, Jorest R. Early myocardial infarction during chemotherapy for testicular cancer. *Tumori*. 2000;86(5):428-30.
416. Ozben B, Kurt R, Oflaz H, Sezer M, Basaran M, Goren T, et al. Acute anterior myocardial infarction after chemotherapy for testicular seminoma in a young patient. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2007;13(4):439-42.

Биографија

Милица Димитријевић Стојановић, доктор медицине, рођена је 29.9.1988. године у Књажевцу. Основну школу је завршила у Сокобањи, средњу медицинску школу у Прокупљу као носилац дипломе „Вук Стефановић Караџић“. Факултет медицинских наука у Крагујевцу је уписала школске 2007/2008. године, а дипломирала 19.9.2013. године на студијском програму Интегрисане академске студије медицине са просечном оценом 9,22. Стручни испит је положила 27.5.2014. године. Школске 2013/2014. године је уписала Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на изборном подручју Имунологија, инфекција и инфламација. 29.9.2016. године је положила усмени докторски испит са оценом 9. Школске 2018/2019. године била је ангажована као факултетски практичне наставе на Катедри за Патолошку анатомију. Од 6.3.2020. запослена на Факултету медицинских наука, као сарадник у настави за ужу научну област Патолошка анатомија. Дана 1.9.2020. започела је специјалистички стаж из Патологије. Пријавила је докторску дисертацију под називом „Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти моноклеарних 5,6-епокси-5,6 дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)“, дана 14.07.2021. године. Школске 2021/2022. године уписала је поново трећу годину Докторских академских студија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Од 01.02.2022. ангажована као сарадник у звању асистента за ужу научну област Патолошка анатомија. Рад из доктората уобјавила је у часопису категоризације М21 под називом: „Platinum(II) complexes with malonic acids: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo antitumor activity and interactions with biomolecules“.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милица Димитријевић Стојановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II) која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.


Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2022. године,


потпис аутора

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

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом: Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти моноклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II) истоветне.

У Крагујевцу, 2022. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Милица Димитријевић Стојановић

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти мононуклеарних 5,6-епокси-5,6-дихидро-1,10-фенантролинских комплекса платине(II)

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 2022 године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>