



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Д. Димитријевић

**Антитуморска активност бинуклеарних комплекса
бабра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне
киселине**

докторска дисертација

Крагујевац, 2023.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Jelena D. Dimitrijević

**Antitumorska aktivnost binuklearnih kompleksa bakra(II) sa
S-izoalkil derivatima tiosalicilne kiseline**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2023.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Jelena D. Dimitrijević

**Antitumor activity of binuclear copper(II) complexes with S-
isoalkyl derivatives of thiosalicylic acid**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

I Аутор
Име и презиме: Јелена Д. Димитријевић
Датум и место рођења: 26.11.1978. Крагујевац
Садашње запослење: биолог у цитогенетској лабораторији Клинике за гинекологију и акушерство Универзитетског клиничког центра Крагујевац
II Докторска дисертација
Наслов: Антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине
Број страница: 88
Број: 3 слике, 2 шеме, 23 фигуре и 12 табела
Број библиографских података: 188
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Микробиологија и имунологија, Онкологија
Коментори: Проф. др Марија Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу Проф. др Јелена Пантић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве тезе: 13.07.2020. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-965/17, 10.12.2020. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник 2. Проф. др Гордана Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан 3. Др Данијела Максимовић-Иванић, Научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник 2. Проф. др Гордана Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан 3. Др Данијела Максимовић-Иванић, Научни саветник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду за ужу научну област Онкологија и генетика, члан
Датум одбране дисертације:

I Autor
Ime i prezime: Jelena D. Dimitrijević
Datum i mesto rođenja: 26.11.1978. Kragujevac
Sadašnje zaposlenje: biolog u Citogenetskoj laboratoriji Klinike za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra Kragujevac
II Doktorska disertacija
Naslov: Antitumorska aktivnost binuklearnih kompleksa bakra(II) sa S-izoalkil derivatima tiosalicilne kiseline
Broj stranica: 88
Broj: 3 slike, 2 šeme, 23 figure i 12 tabela
Broj bibliografskih podataka: 188
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Mikrobiologija i imunologija, Onkologija
Komentori: Prof. dr Marija Milovanović, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu Prof. dr Jelena Pantić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
III Ocena i odbrana
Datum prijave teze: 13.07.2020. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-965/17, 10.12.2020. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Nebojša Arsenijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija i Onkologija, predsednik 2. Prof. dr Gordana Radić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, član 3. Dr Danijela Maksimović-Ivanić, Naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu za užu naučnu oblast Imunologija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Nebojša Arsenijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija; Onkologija, predsednik 2. Prof. dr Gordana Radić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, član 3. Dr Danijela Maksimović-Ivanić, Naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu za užu naučnu oblast Onkologija i Genetika, član
Datum odbrane disertacije:

I Autor
Name and surname: Jelena D. Dimitrijević
Date and place of birth: 26.11.1978. Kragujevac
Current employment: biologist in the Cytogenetic Laboratory, Clinic for Gynecology and Obstetrics at the University Clinical Center Kragujevac
II Doctoral Dissertation
Title: Antitumor activity of binuclear copper(II) complexes with S-isoalkyl derivatives of thiosalicylic acid
No. of pages: 88
No. of images: 3, figures: 23, schemes: 2, tables:12
No. of bibliographic data: 188
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Microbiology and Immunology, Oncology
Mentors: Prof. dr Marija Milovanović, Full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Prof. dr Jelena Pantić, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 13.07.2020.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-965/17, 10.12.2020.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Nebojša Arsenijević, Full professor of Faculty at Medical Sciences, University of Kragujevac for the scientific fields Microbiology and Immunology and Oncology, president 2. Prof. dr Gordana Radić, Assistant professor at Faculty Medical Sciences, University of Kragujevac for the scientific field Pharmaceutic Chemistry, member 3. Dr Danijela Maksimović-Ivanić, Full Research Professor at Institute for Biological Research "Siniša Stanković" in Belgrade for the scientific field Immunology, member
Commission for evaluation and defence of doctoral/artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Nebojša Arsenijević, Full professor of Faculty at Medical Sciences, University of Kragujevac for the scientific fields Microbiology and Immunology; Oncology, president 2. Prof. dr Gordana Radić, Assistant professor at Faculty Medical Sciences, University of Kragujevac for the scientific field Pharmaceutic Chemistry, member 3. Dr Danijela Maksimović-Ivanić, Full Research Professor at Institute for Biological Research "Siniša Stanković" in Belgrade for the scientific field Oncology and Genetic, member
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Бројни нежељени ефекти терапије тумора лековима који садрже платину условили су дизајнирање нових потенцијалних терапеутика у којима је платина замењена другим прелазним металом. Бакар се захваљујући активним системима транспорта у већој концентрацији налази у туморским него у здравим ћелијама, па постоји могућност да комплекси бакра са одговарајућим лигандом имају селективнију цитотоксичност, што је утицало на развој различитих серија комплекса бакра у циљу проналажења потенцијалног селективнијег хемотерапеутика. Циљ ове студије је карактеризација синтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и анализа антитуморског ефекта синтетисаних комплекса. Комплекси су синтетисани, а њихова структура је описана на основу елементарне микроанализе и потврђена на основу инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије и рендгенске структурне анализе. Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине показују цитотоксички ефекат на ћелијама мишјег карцинома колона и плућа, као и хуманог колоректалног и аденокарцинома плућа *in vitro*, индукују апоптозу ћелија мишјег *Lewis* карцинома плућа и заустављају туморске ћелије у G2/M фази ћелијског циклуса. Бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине значајно смањује експресију инфламацијских молекула, про-IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 и VCAM-1, у ткиву примарног хетеротопског мишјег карцинома колона што је праћено значајном редукцијом раста тумора као и смањењем инциденце, величине и броја метастаза у плућима и јетри.

Резултати ове студије указују да бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, показују антитуморски ефекат *in vitro*, као и значајан ефекат *in vivo* у моделу карцинома колона миша.

Кључне речи: бинуклеарни комплекси бакра(II), карцином колона, СТ26 ћелије, цитотоксичност, антитуморска активност, инфламација

ABSTRACT

Numerous side effects of platinum based chemotherapy caused the design of new therapeutics with platinum replaced by another transition metal. Concentration of copper is higher in cancer than in normal cells implying the possibility that copper complexes with the appropriate ligand could have more selective cytotoxicity. This led to the development of different series of copper complexes in order to find a potential more selective chemotherapeutics. The aim of this study is to characterize the synthesized binuclear complexes of copper(II) with S-isoalkyl derivatives of thiosalicylic acid and to analyze their antitumor effect. The complexes were synthesized, and their structure was described on the basis of elemental microanalysis, confirmed on the basis of infrared and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy and X-ray structural analysis. Binuclear complexes of copper(II) with S-isoalkyl derivatives of thiosalicylic acid show a cytotoxic effect on mouse colon lung carcinoma cells, as well as human colorectal and lung adenocarcinoma cells *in vitro*, induce apoptosis of mouse lung carcinoma cells and arrest tumor cells in G2/M phase of the cell cycle. Binuclear complex of copper(II) with S-isoamyl derivative of thiosalicylic acid significantly reduces the expression of inflammatory molecules, pro-IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 and VCAM-1, in tissue of primary heterotopic murine colon cancer, which is accompanied by a significantly reduced tumor growth and the incidence, size and number of lung and liver metastases.

The results of this study indicate that the dinuclear complex of copper(II) with the S-isoamyl derivative of thiosalicylic acid, exert the antitumor effect *in vitro*, as well as significant antitumor effect *in vivo* in the model of mouse heterotopic primary colon cancer.

Keywords: binuclear copper(II) complexes, colon cancer, CT26 cells, cytotoxicity, antitumor activity, inflammation

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Колоректални карцином	2
1.1.1. Канцерогенеза колоректалног карцинома	2
1.1.1.1 Хромозомска нестабилност у развоју колоректалног карцинома	3
1.1.1.2. Микросателитска нестабилност у развоју колоректалног карцинома	4
1.1.1.3. Назубљена неоплазија у развоју колоректалног карцинома	4
1.1.2. Инфламација и колоректални карцином	5
1.1.2.1. Хронично запаљење удружено са канцерогенезом	6
1.1.2.2. Запаљење индуковано колоректалним карциномом	7
1.1.2.3. Запаљење индуковано терапијом колоректалног карцинома.....	7
1.1.3 Хемотерапија колоректалног карцинома	8
1.2. Бакар и тумори.....	8
1.2.1 Бакар у канцерогенези.....	9
1.2.2. Бакар у терапији тумора.....	10
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	11
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	13
3.1. Материјали и мерења	14
3.2. Синтезе	14
3.2.1. Општи поступак за синтезу S-изоалкил тиосалицилних киселина (L1)–(L3)	14
3.2.2. Припрема бакар (II)-комплекса са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине, $[Cu_2(S-ipr-thiosal)_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ (C1).....	16
3.2.3. Припрема бакар (II)-комплекса са S-изобутил дериватом тиосалицилне киселине, $[Cu_2(S-ibu-thiosal)_4(H_2O)_2]$ (C2)	16
3.2.4. Припрема бакар (II)-комплекса са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, $[Cu_2(S-iam-thiosal)_4(H_2O)_2]$ (C3).....	17
3.3. Рендгенска кристалографија монокристала.....	17
3.4. Испитивање интеракција комплекса са ДНК апсорпционом методом	19
3.5. Испитивање интеракција комплекса са ДНК флуориметријском методом.....	19

3.6. Испитивање интеракција комплекса са ДНК мерењем вискозности	19
3.7. Испитивање интеракција комплекса са BSA флуориметријском методом	20
3.8. Ћелијске културе	20
3.9. МТТ тест	21
3.10. Квантитативно испитивање апоптотске смрти	21
3.11. Анализа ћелијског циклуса	22
3.12. Анализа експресије Ki-67 молекула проточном цитометријом	22
3.13. Методе за испитивање антитуморске активности комплекса <i>in vivo</i>	22
3.13.1. Експерименталне животиње	22
3.13.2. Еспериментални модел карцинома колона	23
3.13.3. Израда патохистолошких препарата и верификација броја и величине метастатских колонија	23
3.13.4. Анализа експресије гена у ткиву примарног тумора методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену	24
4. РЕЗУЛТАТИ	25
4.1. Ситеза и хемијска карактеризација	26
4.2. Рендгенска структурна анализа комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-}i\text{pr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1) 28	
4.3. Испитивање интеракција комплекса са ДНК апсорпционом методом	32
4.4. Испитивање интеракција комплекса са ДНК флуориметријском методом	34
4.5. Вискозност	35
4.6. Студије везивања протеина	36
4.7. Студије докинга	37
4.8. Утицај бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на вијабилност туморских ћелија <i>in vitro</i>	42
4.9. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине индукују апоптозу туморских ћелија	47
4.10. Антипролиферативна активност комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на ћелијама колоректалног и карцинома плућа	52
4.11. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине заустављају туморске ћелије у G2/M фази ћелијског циклуса	54
4.12. Антитуморски ефекат комплекса бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине у хетеротопском моделу карцинома колона миша	56
4.12.1. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине редукује раст примарног хетеротопског карцинома колона миша	56

4.12.2. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине редукује метастазе у јетри и плућима мишева са примарним хетеротопским карциномом колона	59
4.12.3. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине у ткиву примарног тумора смањује експресију маркера канцерских матичних ћелија Nanog	62
4.12.3. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине смањује експресију маркера инфламације у ткиву примарног тумора	63
5. ДИСКУСИЈА	65
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	71
7. РЕФЕРЕНЦЕ.....	73

1. УВОД

1.1. Колоректални карцином

Колоректални карцином је болест коју карактерише аберантна пролиферација жлезданих епителних ћелија, а која захвата искључиво колон и ректум. Колоректални карцином спада у најчешће канцере у општој популацији, трећи је по реду најчешће дијагностикован тумор у свету и међу туморима други по реду као најчешћи узрок смрти (1). И генски и фактори околине представљају факторе ризика за развој колоректалног карцинома (2). Код особа које болују од Кронове болести и улцерозног колитиса се са годинама повећава ризик од развоја овог тумора (3). Упркос сталном напретку у дизајнирању антитуморских лекова већина колоректалних карцинома је резистентна на конвенционалну терапију.

Мутације одређених гена имају за последицу појаву колоректалног карцинома као што се дешава и у осталим туморима. Ове мутације се јављају у онкогенима, тумор супресорским генима и генима који кодирају молекуле укључене у поправку ДНК (4). У зависности од порекла мутације колоректални карциноми се деле на спорадичне, наслеђене и фамилијарне. Колоректална канцерогенеза се објашњава као резултат мултиплих генских мутација (4). Колоректални тумори имају можда највећу стопу мутација међу туморима, са идентификованим десетинама соматских мутација. Колоректални карциноми се на основу броја мутација деле на: хипермутиране са више од 12 мутација на 10^6 парова база и нехипермутиране са мање од 8.24 мутација на 10^6 парова база (5).

1.1.1. Канцерогенеза колоректалног карцинома

Колоректални карцином се развија када епителне ћелије стекну низ генских или епигенских промена које за резултат имају њихову хиперпролиферацију (6). Иако су колоректални карциноми хетерогени на генском нивоу, ипак се сви они развијају кроз неколико патогенетских механизма који се описују као: 1. хромозомске нестабилности, CIN (од енгл. *chromosome instability*), 2. микросателитска нестабилност, MSI (од енгл. *microsatellite instability*) и 3. назубљена неоплазија који се често донекле и преклапају (7).

Већина колоректалних тумора настаје из преканцерских лезија. Аденоми настају када се поремете механизми који регулишу поправку ДНК и пролиферацију ћелија. Константна обнова епитела је неопходна због континуираног губитка површинских ћелија цревне слузокоже, а пролиферација се јавља само у бази крипте. Како измењене (имају поремећен механизам којим контролишу пролиферацију и поправку ДНК) ћелије напредују према лумену дебелог црева, не дешава се очекујући процес терминалне диференцијације и евентуално апоптозе што резултује формирањем дискретних аденома. Током времена, аденоматозни полипи се повећавају, развијају све више диспластичних карактеристика и могу на крају да стекну инвазивни потенцијал. Мутације гена APC (*adenomatous polyposis coli*) који припада групи тумор супресорских гена (8) или BRAF онкогена (9) иницирају догађаје који резултују појавом аденома или назубљених полипа. Наредни догађаји варирају у зависности од специфичног патогенетског пута. Додатне генске промене су неопходне за прогресију од раних до средњих неоплазија, затим до узнапредовалих полипа са дисплазијом високог степена, а касније и инвазивних тумора. Међутим, не морају сви аденоми да

напредују до карцинома што се дешава ако изостану акумулације специфичних мутација одређеним редоследом. Временски оквир развоја колоректалног карцинома одређује сам пут канцерогенезе. Канцерогенеза путем хромозомске нестабилности може да траје 10 и више година, а развој тумора путем микросателитске нестабилности може да траје само неколико година.

1.1.1.1 Хромозомска нестабилност у развоју колоректалног карцинома

Овај пут развоја примећен у 65%–70% спорадичних колоректалних тумора (10, 11) карактеришу промене хромозома које укључују промене броја соматских копија (анеуплоидија, брисање, уметање, амплификација гена или губитак хетерозиготности). Тумори који се развијају овим путем сматрају се нехипермутиранима. Механизми настанка CIN-а обично се одликују поремећајима хромозомске сегрегације, као што је поремећено одвајање сестринских хроматида; поремећеним старењем ћелија због скраћења теломера и које кулминира реорганизацијом генома; нефункционалном контролом оштећења ДНК; и губитком хетерозиготности на тумор супресорском гену. Ове кариотипске абнормалности су повезане са мутацијама тумор супресорских гена APC и TP53 и активирајуће мутације у генима KRAS и алфа каталитичкој подјединици фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфонат 3-киназа, PI3K. Највероватније је мутација APC најранија генска промена у колоректалној канцерогенези (12). Губитак активности гена APC изазива нуклеарну транслокацију бета-катенина и активацију Wnt сигналног пута. Wnt сигнални пут је важан регулатор пролиферације цревних епителних ћелија (13, 14). Активација овог пута праћена је активацијом експресије гена MYC, циклин D1 и VEGF (од енгл *Vascular Endothelial Growth Factor*) чији су производи укључени у канцерогенезу (15). Мутација гена APC се налази у око 80% колоректалних карцинома који настају механизмом хромозомске нестабилности (5).

Активирајуће мутације гена KRAS се дешавају обично после мутација APC и детектују се у око 40% колоректалних тумора (16). Производ KRAS гена је компонента неколико сигналних путева укључујући сигнални пут са рецептора за епидермални фактор раста EGFR (од енгл *Epidermal Growth Factor Receptor*). Активација KRAS резултује конститутивном активацијом Raf–MEK–ERK пута, PI3K (од енгл *Phosphoinositide 3 Kinase*) пута и транскрипционог фактора NF-κB. Резултат активације ових путева је фосфорилација и активација ензима који подстичу прогресију ћелијског циклуса (17). Овај сигнални пут се истражује као мета терапије циљаним терапеутицима у метастатском колоректалном карциному. Већина колоректалних карцинома са мутацијама KRAS садржи и мутације у генима који кодирају каталитичке подјединице PI3K, киназе која фосфорилише сигнални молекул фосфатидилинозитол. Већа активност PI3K може повећати синтезу простагландина и инхибирати апоптозу ћелија колоректалног карцинома (18). Мутације P53 праћене губитком функције налазе се чешће у колоректалном карциному него у аденомима са микроскопским фокусима инвазивног канцера и чешће у инвазивним аденомима него у бенигним аденомима (19). Удруженост фреквенције мутација TP53 и стадијума лезија указује да мутације овог гена промовишу развој тумора у каснијим фазама канцерогенезе (20, 21).

1.1.1.2. Микросателитска нестабилност у развоју колоректалног карцинома

Колоректални карциноми могу се развити и услед хипермутација базних парова соматске ДНК услед неадекватне функције механизма поправке ДНК. Мутације гена који кодирају молекуле укључене у поправку ДНК (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) изазивају нестабилност микросателитских региона. Микросателитски региони су понављајуће тандем секвенце у којима се, током покушаја ДНК полимеразе да веже ове понављајуће секвенце, акумулирају грешке. Убацавање неадекватног броја база у ове непроменљиве области или проклизавање током синтезе новог ланца може да генерише мутацију која мења оквир читања што може да резултује продукцијом нефункционалног протеина или одсуством продукције. Уколико нема озбиљних мутација гена који кодирају молекуле укључене у поправку ДНК, овај систем препознаје раније описане грешке и обавља своју функцију поправке ДНК пре процеса репликације. У туморским ћелијама са микросателитском нестабилношћу нема адекватне детекције и поправке погрешно упарених база ДНК па се оне неометано деле са насталим мутацијама и уједно стичу нове мутације. Микросателитска нестабилност детектована је у око 15% спорадичних колоректалних карцинома и у скоро свим колоректалним карциномима које развијају особе са Линчевим синдромом који карактерише *germline* мутација гена који кодирају молекуле укључене у поправку ДНК (22). Микросателитска нестабилност гена који кодира субјединицу 2 рецептора за TGF- β (*TGFBR2*) детектована је у преко 90% колоректалних карцинома који су настали механизмом MSI (23). Други гени који су захваћени микросателитском нестабилношћу кодирају протеине који регулишу пролиферацију (GRB1, TCF4, WISP3, ACVR2, IGF2R, AXIN2, CDX), прекид ћелијског циклуса и апоптозу (CASP5, PRDM2, BCL10, PTEN, PA2G4, FAS), поправљају ДНК (MBD4, BLM, CHK1, MLH3, RAD50, MSH3, MSH6) (24, 25).

Догађаји који иницирају туморогенезу путем који укључује MSI варирају. Мутације гена APC се налазе у 35%-50% тумора који су настали механизмом MSI (5, 26) што указује да почетни догађај формирања аденома може да буде заједнички за колоректалне карциноме настале механизмом MSI и механизмом CIN. Једном када се појави микросателитска нестабилност, колоректални карцином се развија брже него механизмом хромозомске нестабилности. Колоректални карциноми са високим нивоом микросателитске нестабилности повезани су са краћим временом прогресије; карцином се онда развија у року од 1–3 године за разлику од деценија колико траје канцерогенеза уколико се развија механизмом хромозомске нестабилности (27).

1.1.1.3. Назубљена неоплазија у развоју колоректалног карцинома

Назубљени полипи могу да претходе развоју око 10-15% свих колоректалних карцинома (28). Тај пут настанка колоректалног карцинома се означава као механизам назубљене неоплазије. Велики проценат интервалних колоректалних карцинома (оних који се развијају у оквиру препорученог периода надзора који обично траје 3-5 година) вероватно настају механизмом назубљене неоплазије (29, 30). Механизам назубљене неоплазије је посебан вид канцерогенезе који није довољно разјашњен. Препознатљива карактеристика пута назубљене неоплазије је активирајућа мутација V600E BRAF-а,

који је компонента MAP киназног пута (9). BRAF је мутиран у већини сесилних назубљених аденома, а веома ретко у конвенционалним аденомима што указује да је механизам назубљене неоплазије посебан пут развоја колоректалног карцинома (31). Након почетне мутације гена BRAF, колоректални карцином који настаје механизмом назубљене неоплазије може да се даље развије на два начина. Може да се деси микросателитска нестабилност и канцерогенеза се даље одвија по типу MSI, или могу да се десе мутације TP53 гена и активација неколико сигналних путева укључујући Wnt и TGF β сигнални пут и механизам епително мезенхимске транзиције, и развијају се тумори који имају микросателитску стабилност (26). Тумори који се развијају кроз било који од описана два крака пута назубљене неоплазије такође обично показују високе нивое метилације CpG острва која се налазе у регионима промотора и уколико су у питању промотори тумор супресорских гена на крају је могућ развој тумора. Молекулски механизми овог процеса хиперметилације нису разјашњени.

1.1.2. Инфламација и колоректални карцином

Иако су основи генских промена у колоректалном карциному утврђени, одређивање само генских промена није довољно за подкласификацију типова тумора и тачну прогнозу преживљавања пацијента. Јасно је да је у канцерогенези колоректалног карцинома битна, поред неколико кључних мутација и блиска интеракција мутираних ћелија са туморском микросредином. Туморска микросредина садржи фибробласте удружене са туморским ћелијама, васкуларне ћелије и ћелије имунског система које блиско међусобно делују на реципрочан начин и могу позитивно или негативно да контролишу пролиферацију, ћелијску смрт, избегавање супресора раста ћелија, енергетски метаболизам и избегавање имунског одговора, а утичу и на ангиогенезу и инвазивност туморских ћелија. Ћелије присутне у строми утичу на канцерогенезу али њихова анализа има и битан клинички значај. Присуство лимфоцита који инфилтришу тумор повезано је са бољом прогнозом унапредовалог колоректалног карцинома (32). Показано је да је присуство Th1 ћелија које продукују IFN- γ у колоректалном карциному повезано са повољном прогнозом, док присуство Th17 ћелија утиче на мање повољан исход што указује на кључну улогу T лимфоцита у ограничавању раста тумора (33). У употреби је имуноскор за колоректални карцином који се базира на квантификацији популација цитотоксичких и меморијских T ћелија који чак има бољу прогностичку вредност у поређењу са најчешће коришћеном AJCC (*American Joint Committee on Cancer*)/UICC (*Union for International Cancer Control*) TNM класификацијом (34). Док инфилтрација цитотоксичким T лимфоцитима, Th1 и меморијским ћелијама веома добро корелира са прогнозом свих типова канцера, инфилтрати регулаторних T ћелија, Th2, Th17, NK ћелија, макрофага, супресорских ћелија мијелоидног парекла MDSC (од енгл. *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) показују већу варијабилност приликом процене прогнозе што зависи и од стадијума и врсте канцера и анализе функционалног фенотипа имунских ћелија (35, 36). Такође, формирање терцијарних лимфоидних структура на маргини инвазије или строми тумора, а не у самом туморском ткиву повезано је са повољним исходом колоректалног карцинома (37). Реципрочна интеракција ћелија унутар туморске микросредине која значајно утиче на све стадијуме канцерогенезе и пластичност и туморских и осталих ћелија у великој мери зависи од присутног запаљења (38). Тако да би детаљно разумевање молекулске и ћелијске основе имунопатогенезе колоректалног карцинома

омогућило развој нових, можда ефикаснијих терапеутика у односу на конвенционалне који циљају само туморске ћелије. Према тренутку у ком запаљење утиче на патогенезу колоректалног карцинома, могу се разликовати три типа запаљења: хронично запаљење које претходи канцерогенези, запаљење изазвано тумором и запаљење индуковано терапијом. Заједничка карактеристика све три врсте запаљења је активација ћелија урођене имуности која подстиче развој тумора и успостављање имуносупресивне туморске микросредине.

1.1.2.1. Хронично запаљење удружено са канцерогенезом

Главни фактори ризика за развој колоректалног карцинома, а који претходно изазивају хронична запаљења колона су дуготрајна и лоше контролисана инфламацијска болест црева и хронично запаљење гастроинтестиналног тракта изазвано лошим навикама у исхрани (39). Да би се развио тумор потребна су два догађаја на које значајно утиче запаљење. Први је акумулација мутација или епигенских промена, које за последицу имају или инактивацију тумор супресорских гена или хиперактивацију онкогена што ћелијама омогућава раст и преживљавање, а други који мора да следи први је промоција тумора, односно клонска експанзија ћелија које садрже мутације и прерастање тих клонова у праве туморе. Реактивна једињења кисеоника и азота могу изазвати различите врсте оштећења ДНК (једноланчани дволанчани прекиди, модификације нуклеотида, уклањање база) у цревним епителним ћелијама, па повећана производња ових молекула у мијелоидним ћелијама у хроничном запаљењу може да индукује директну трансформацију интестиналних епителних ћелија (40). Поред тога хронично запаљење црева може да утиче на функцију епителне баријере и да тако омогући контакт матичних ћелија цревног епитела са мутагенима присутним у околини или да их доведе у близак контакт са мијелоидним ћелијама које ослобађају генотоксичне молекуле (41). Прекид епителне баријере омогућава контакт интестиналних епителних ћелија и коменсалних бактерија које такође могу да имају проканцерске ефекте. Хронично запаљење црева праћено је регенерацијом ткива што подстиче пролиферацију и клонску експанзију евентуално присутних трансформисаних ћелија (промоција тумора) као и дедиференцијацију ћелија које нису матичне у ћелије сличне матичним у циљу регенерације оштећеног ткива (42). Интестиналне матичне ћелије су много способније за одупирање агенсима који оштећују ДНК у односу на оне које нису матичне, а дедиференцијацијом постмитотских ћелија показано је да се стиче способност иницирања тумора. Коначно, запаљење може да повећа стопу мутација као и број ћелија које би потенцијално могле да иницирају развој тумора (43). Запаљење утиче и на кључне сигналне путеве који потичу од рецептора за цитокине TNF и IL-1 који активирају NF-κB и IL-6 који активира STAT3, а који контролишу процесе иницијације и промоције колоректалног карцинома (44-48). Описана је и мутација TP53 у инфламацијској средини у току развоја колоректалног карцинома која појачава сигнализацију у којој учествују TNF, STAT3 и NF-κB (49, 50). Запаљење може такође да утиче на епигенске промене које су утишавањем тумор супресорских гена повезане са развојем канцера (51).

У току запаљења процесима који зависе од циклооксигеназе -1 и -2 настају липидни медијатори који имају велики утицај на све стадијуме канцерогенезе колоректалног тумора. Простагландин E2, најзаступљенији простагландин у колоректалном карциному, промовише иницијацију и раст тумора индукујући експресију ензима укључених у

метилацију и клонску експанзију канцерских матичних ћелија активацијом NF-κB сигналног пута (52). Простагландин E2 такође индукује диференцијацију у мијелоидне супресорске и T регулаторне ћелије (53) и инхибира ремоделовање туморске микросредине подстичући тако инвазивност тумора (54).

1.1.2.2. Запаљење индуковано колоректалним карциномом

Тумори могу изазвати запаљење и њихов локални раст и метастазирање онда зависе од интеракција са ћелијама унутар туморске микросредине (38). Један од првих догађаја након мутације APC и активације Wnt сигналног пута је губитак цревне баријере што омогућава микроорганизмима из лумена да остваре контакт са резидентним мијелоидним ћелијама, активирају их што за последицу има продукцију IL-23 и IL-17 који су рани промотори колоректалног карцинома (55). Губитак функције p53 у каснијим фазама канцерогенезе нарушава интегритет епитела што омогућава микроорганизмима индуковану активацију STAT3 и NF-κB, а тиме изазива и инфламацију (56). Дакле, активација онкогена и губитак функције тумор супресора не само да директно промовишу преживљавање и пролиферацију ћелија канцера, већ и одржавају запаљење изазвано тумором стимулацијом продукције цитокина, фактора раста и хемокина који регрутују ћелије имунског система у туморско ткиво.

Хипоксија и недостатак хранљивих материја у тумору чија величина превазилази омогућено снабдевање крвљу изазивају некротску смрт која је праћена ослобађањем молекулских образаца удруженим са оштећењем ткива као што је HMGB1, мокраћна киселина, АТР који подстичу продукцију IL-1 (57). Хипоксија тумора подстиче експресију фактора HIF1α у туморским и ћелијама туморске микросредине што подстиче ослобађање TGF-β из фибробласта удружених са туморским ћелијама. TGFβ инхибира презентацију антигена у дендритским ћелијама, пролиферацију и ефекторске функције T лимфоцита, индукује развој регулаторних T и инхибира функцију цитотоксичких NK ћелија (58).

1.1.2.3. Запаљење индуковано терапијом колоректалног карцинома

Запаљење изазвано терапијом такође значајно утиче на ток колоректалног карцинома. Радиотерапија и хемотерапија изазивају смрт туморских ћелија као и промене унутар туморске микросредине што активира механизам „зарастања рана“. Запаљење изазвано терапијом је пре нежељена последица терапије него циљ, али је важна детерминанта терапијског одговора и релапса, а може имати и анти- и про-туморски ефекат у зависности од контекста. Умируће туморске ћелије ослобађају молекулске образце удружене са оштећењем ткива, HMGB1, АТР, дволанчана ДНК, калретинулин који активирају ћелије које презентују антигене. Стимулисана активација дендритских ћелија у комбинацији са појачаним ослобађањем туморских неоантигена из умирућих ћелија, би могла да *de novo* активира специфичне T лимфоците што би резултовало појачаним имунским надзором тумора (59). Међутим, бројни експериментални и клинички подаци показују да умируће ћелије тумора такође промовишу канцерогенезу

и инхибирају антитуморски имунски одговор. IL-1 α који ослобађају некротичне туморске ћелије може да промовише малигну трансформацију, ангиогенезу и метастазирање. IL-1 α активира и индукује развој инфламацијског типа фибробласта који подстичу онкогенезу (60). Смрт туморских ћелија изазвана терапијом може да подстакне продукцију фактора раста Wnt и епидермалног фактора раста, цитокина TNF, IL-17 и IL-6 у ћелијама туморске микросредине што промовише опстанак преосталих туморских ћелија и доприноси резистенцији на терапију (38).

1.1.3 Хемотерапија колоректалног карцинома

Као и сваки други карцином, колоректални карцином се класификује од стадијума 0 (*carcinoma in situ*), 1 (инвадиран је слој *lamina muscularis propria*), 2 (захвећена је и сероза), 3 (захваћен је и висцерални перитонеум) и 4 (метастазира крвним и лимфним путем) (61).

Стадијум одређује озбиљност болести и доступне терапије (62). Иако је операција стандардни избор лечења за стадијуме 0–2 колоректалног карцинома, стадијум 3 захтева операцију и адјувантну хемотерапију, а стадијум 4 и рекурентни колоректални карцином захтевају операцију, хемотерапију и циљану терапију; међутим, нажалост, до сада нема познатог лека који гарантује излечење.

Хемотерапија или радиотерапија се могу користити пре или после операције како би се смањио или стабилизовао тумор (63). Хемотерапија обухвата терапију са једним агенсом (првенствено флуороурацил FU)) и режиме са више агенаса, укључујући оксалиплатину (OX), иринотекан (IRI) и капецитабин (CAP или XELODA или XEL). Комбиновани режими терапије FOLFOX (5-FU + OX), FOXFIRI (5-FU + IRI), XELOX или CAPOX (CAP + OX) и CAPIRI (CAP + OX) остају главни приступи прве линије лечења. Пацијентима са лошим перформансама или малим ризиком од погоршања препоручује се терапија једним леком. Ове терапије имају и одређене недостатке као што су системска токсичност, незадовољавајућа стопа одговора, варијабилна урођена и стечена резистенција и ниска селективност за туморско ткиво. Зато постоји стална потреба за истраживањем нових начина да се побољша или замени стандардна хемотерапија колоректалног карцинома.

1.2. Бакар и тумори

Бакар је есенцијални елемент присутан у траговима који игра веома важну улогу у многим физиолошким ћелијским процесима. Неопходан је за нормално функционисање великог броја различитих ензима као што су Cu/Zn супероксид-дисмутаза, цитохром оксидаза, тирозиназа, лизил оксидаза, допамин β -хидроксилаза, церулоплазмин, бакар амин оксидаза (64).

Важни биолошки процеси у које је укључен бакар су дисање, инхибиција слободних радикала који могу оштетити мембрану ћелија и ДНК, помаже телу у производњи енергије, формирању везивног ткива и костију, учествује у метаболизму кисеоника и гвожђа, сазревању ванћелијског матрикса и неуропептида и има улогу у неуроендокриној сигнализацији (65, 66).

У телу одраслих особа налази се око 100 mg бакра у мишићима, костима, јетри, бубрезима, срцу и мозгу (67). Бакар унет храном или преко суплемената се апсорбује у

дигестивном тракту и то у желуцу, дванаестопалачном цреву и горњем делу танког црева. Након апсорпције у крви се бакар везује за албумин и транспортује до јетре где се и депонује. Из јетре везан за церулоплазмин бакар се преноси до органа и ћелија којима је потребан. У серуму је концентрација бакра 12–25 μM док у ткивима варира између 15 и 180 $\mu\text{M/g}$. Оксидо-редукционе способности чине бакар потенцијално неопходним али и цитотоксичним за ћелије. Слободни јони бакра су веома цитотоксични па је потребно да концентрација јона бакра унутар ћелија буде увек на оптималном нивоу и добро регулисана. Веома је важно да транспорт бакра буде строго контролисан како не би наступио вишак редокс активности. Зато се бакар транспортује увек везан за протеине. Дистрибуција бакра је такође прецизно регулисана кроз неколико ћелијских механизма. Транспорт бакра у ћелије сисара регулише протеин за транспорт бакра 1. Бакар у ћелије улази у редукованом облику [Cu(I)] где се везује за шапероне за бакар или глутатион, а потом преноси на металотионеин или дистрибуира у одређене одељке ћелија (68). Иако је бакар есенцијални микронутријент, у слободном облику може да буде веома токсичан по ћелије (66). Исто тако и нерегулисано складиштење бакра у ћелијама може да изазове оксидативни стрес и цитотоксичност (69).

Поремећај хомеостазе бакра присутан је код неких генски условљених обољења као што су: Вилсонова болест, Менкесова болест, Медник синдром, *Huppke-Brendl* синдром. Поремећаји метаболизма бакра могу бити и стечени када настају због смањеног или превеликог уноса бакра када постоји опасност од оштећења јетре, анемије, неутропеније, абнормалности костне сржи. Ниже концентрације бакра присутне су код Менкесове и Паркинсонове болести. Повећана концентрација бакра је присутна код Вилсонове болести, различитих запаљенских процеса, карцинома, цирозе јетре и холестазе (70).

1.2.1 Бакар у канцерогенези

Познато је да је код малигних болести ниво бакра озбиљно нарушен и да бакар као кофактор многих ензима, има улогу у ангиогенези, бржем расту и метастази тумора (71). Концентрација бакра у серуму и туморском ткиву значајно је повећана код пацијената са канцером у поређењу са здравим особама. Значајно веће концентрације бакра у серуму су повезане са бројним туморима као што су карцином дојке, грлића материце, јајника, плућа, желуца, бешике, штитасте жлезде, оралне слузнице, панкреаса, главе и врата (72, 73). У неким туморима попут колоректалног и карцинома дојке, повећане концентрације бакра су у снажној корелацији са стадијумом и прогресијом тумора (74, 75). Код леукемија је уочено смањење концентрације бакра у периоду ремисије, што указује да је дистрибуција бакра промењена код пацијената са канцером (76). Основни механизми који утичу на промену концентрације бакра у серуму оболелих од канцера још увек нису разјашњени. Изложеност високим концентрацијама бакра повезана је са неуроендокриним туморима панкреаса и карциномом простате (77, 78). Улога бакра у етиологији и прогресији тумора је доста проучавана у последње две деценије. Као метал способан да индукује редокс реакције, бакар је способан да утиче на генерисање реактивне врста кисеоника интрацелуларно што изазива активацију различитих сигналних механизма који повећавају пролиферацију туморских ћелија (79). Показано је и да је бакар укључен у регулацију MAP киназног и BRAF сигналних путева који иначе регулишу ћелијску пролиферацију, диференцијацију и покретљивост (80). Недавно је показано да је

повећана концентрација бакра повезана са повећаном експресијом PD-L1 (*Programmed Death Ligand 1*) у туморским ћелијама што омогућава туморским ћелијама избегавање имунског одговора. У истој студији је такође показано да хелатори Си појачавају деградацију PD-L1 посредовану убиквитином што резултује инфилтрацијом Т лимфоцита и природних ћелија убица на месту тумора, чиме сузбијају раст тумора и побољшавају преживљавање у мишјем моделу болести (81). Бакар такође подстиче пролиферацију ендотелних ћелија и ангиогенезу којом се туморима обезбеђују кисеоник и есенцијалне хранљиве материје (82). Бакар такође стабилизује експресију HIF1 индукованог хипоксијом, који је главни стимулатор ангиогенезе и активира или стимулише експресију неколико ангиогених фактора укључујући фактор раста фибробласта (FGF), фактор раста васкуларног ендотела (VEGF), фактор некрозе тумора алфа (TNF- α), IL-1, IL-6 и фибронектина (83). Удружено са већом концентрацијом бакра повећава се експресија ензима супероксид дисмутазе SOD1 који регулише функцију ендотела и стимулише продукцију VEGF и ангиогенезу (72). Бакар појачава метастатски потенцијал тумора активацијом протеина који су укључени у ремоделовање екстрацелуларног матрикса и настанак преметастатских ниша (84).

1.2.2. Бакар у терапији тумора

Како су прекомерне концентрације бакра у туморима повезане са појачаном пролиферацијом, ангиогенезом и метастатским потенцијалом туморских ћелија, нове стратегије у лечењу канцера имају за циљ утицај на хомеостазу бакра. (73). Постоје два главна приступа која су тестирана у претклиничким и клиничким условима, а укључују коришћење хелатора бакра којим се смањује биорасположивост овог метала директним везивањем за бакар и коришћење јонофора бакра којим се повећава интрацелуларна концентрација бакра, а циљ је испољавање антитуморских ефеката бакра (стимулација продукције слободних једињења кисеоника, инхибиција протеазома, индукција апоптозе) у самим туморским ћелијама (73).

Успех различитих једињења која садрже платину (цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина) у клиничкој примени у лечењу широког спектра карцинома удружен са релативно ниским трошковима лечења утицао је на повећано интересовање за развој нових комплекса метала који би имали потенцијално добар клинички ефекат (85, 86). Међу прелазним металима који се користе у истраживању нових потенцијално активних металокомплекса бакар је нашао широку примену захваљујући интересантним антиканцерским карактеристикама које су праћене мањим нежељеним дејствима (72). Оштећење ДНК које настаје након излагања комплексима бакра слично је оштећењима која настају применом једињења платине (87).

Све већи број истраживачких група је фокусиран на дизајн и синтезу бакар(II)-комплекса који остварују интеракције са биомолекулима и испољавају одређено фармаколошко дејство (88-90). Познато је да салицилати, смањењем упале, смањују ризик од развоја колоректалног карцинома (91). Описани су антиинфламацијски ефекти и тиосалицилне киселине (92). Недавно је описана серија комплекса бакра(II) са S-алкил дериватом тиосалицилне киселине који показују цитотоксичку активност на ћелијама мишјег карцинома колона (93), као и бакра(II) са S,O-тетраденатним дериватима тиосалицилне киселине као лигандима који су показали солидну антитуморску активност на ћелијама хуманог колоректалног карцинома, карцинома дојке и аденокарцинома плућа *in vitro* (94).

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је карактеризација и испитивање антитуморске активности синтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на ћелијама тумора мишјег и хуманог порекла *in vitro*, као и *in vivo* у хетеротопском моделу мишјег карцинома колона.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити структуру синтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине
2. Испитати интеракцију синтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине са ДНК (ДНК тимуса говечета) и BSA (хуманим албумином серума).
3. Испитати цитотоксичку активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на туморским ћелијама мишјег и хуманог порекла *in vitro*.
4. Испитати потенцијалну проапототску активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине.
5. Испитати потенцијалну антипролиферативну активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине.
6. Анализирати ефекат бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на ћелијски циклус туморских ћелија.
7. Испитати ефекат бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на раст и прогресију тумора у моделу хетеротопског карцинома колона миша и анализирати могуће механизме антитуморске активности *in vivo*.

Хипотезе истраживања:

- Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне показују значајан антитуморски ефекат на туморске ћелије мишјег и хуманог порекла *in vitro*.
- Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне успоравају раст и прогресију мишјег карцинома колона.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјали и мерења

Реагенси су комерцијално добијени и коришћени даље без пречишћавања. Елементарне анализе су рађене на *Vario III CHNOS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme GmbH*. За инфрацрвени спектар коришћени су *Perkin-Elmer FTIR 31725-X* спектрофотометар и КВг (калијум-бромид) техника пелета. Магнетна мерења синтетисаних комплекса изведена су на 294 К Евансовом методом применом *MSB-MK1* ваге (*Sherwood Scientific Ltd.*) са $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ (жива (II)-тетратиоцијанатокобалтат (II)) као калибрант; дијамагнетне корекције су израчунате из Паскалових константи. Вредности моларне проводљивости свих комплекса у *DMSO (dimethyl sulfoxide)* мерене у концентрацији од 10^{-3} М биле су у опсегу 8–17 $\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}$, што указује да су се сви комплекси понашали као неелектролити. 9.8 GHz *EPR* спектра снимљени су на собној температури на *Bruker Elexsys II 540 EPR* спектрофотометру под следећим условима: микроталасна снага 6.325 mW, амплитуди модулације 5 G, фреквенци модулације од 100 kHz, и времену конверзије од 240 ms. Узорци (30 μl 0.5 mM воденог раствора у дејонизованој води од 18 M Ω) били су увучени у непропусне тefлонске цеви (*Zeus industries, Raritan, NJ*). Спектри су снимљени и анализирани помоћу *Bruker Xepc* софтвера.

3.2. Синтезе

3.2.1. Општи поступак за синтезу S-изоалкил тиосалицилних киселина (L1)–(L3)

S-изоалкил деривати тиосалицилне киселине добијени су реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим изоалкил-хлоридима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу. У раствор добијен растварањем (1 mmol) тиосалицилне киселине у 50,00 mL 30% етанола додаје се раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 mL дестиловане воде). Одговарајући изоалкил-хлорид (изопропил-(L1), изобутил-(L2), изоамил-(L3)) (2,00 mmol) се раствори у 5,00 mL етанола и постепено додаје у малим порцијама у претходно припремљену бистру реакциону смешу. Тако добијена реакциона смеша остави се током ноћи на 60°C. Након тога раствор се пренесе у кристализациону шољу и упари на воденом купатилу ради удаљавања етанола. У добијени водени раствор додаје се (2,00 mM) раствор хлороводоничне киселине услед чега се ствара бели талог одговарајућег S-изоалкил деривата тиосалицилне киселине. Тако добијени производ се одвоји цеђењем, испере великом количином дестиловане воде и суши преко ноћи на вакууму. S-изоалкил деривати тиосалицилне киселине су добијени у приносу 85-95 %.

S-изопропил тиосалицилна киселина (L1): температура топљења 117°C, бели прах. **IR (KBr, cm^{-1}):** 3788, 3699, 3660, 3052, 2979, 2968, 2929, 2866, 2813, 2641, 2554, 1951, 1925, 1677, 1588, 1561, 1461, 1445, 1404, 1381, 1365, 1326, 1310, 1281, 1270, 1257, 1236, 1171, 1150, 1110, 1061, 1052, 1040, 919, 810, 798, 739, 703, 690, 653, 553, 527, 515, 482, 459 (Fig. S1).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 1,39 (d, 6,6 Hz, 6H), 3,46–3,59 (m, 1H), 7,21–7,29 (m, 1H), 7,41–7,54 (m, 2H), 8,15 (dd, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,4 Hz, 1H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, d ppm):** 22,7, 36,8, 125,1, 128,3, 129,1, 132,6, 132,8, 139,8, 170,4.

Резултати елементалне микроанализе за **S-изопропил тиосалицилну киселину**

$$M(C_{10}H_{12}O_2S) = 196,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	61,20	16,34	6,16
Нађено:	60,89	16,70	5,85

S-изобутил тиосалицилна киселина (L2): температура топљења 104°C, бели прах.

IR (KBr, cm⁻¹): 3067, 2963, 2926, 2869, 2721, 2649, 2560, 1950, 1805, 1679, 1587, 1559, 1463, 1429, 1412, 1383, 1366, 1314, 1290, 1271, 1252, 1168, 1152, 1109, 1060, 1046, 978, 914, 809, 738, 704, 689, 651, 553, 526, 515, 491, 459.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 1,11 (d, 6,6 Hz, 6H), 1,90–2,10 (m, 1H), 2,82 (d, 6,8 Hz, 2H), 7,15–7,23 (m, 1H), 7,32–7,36 (m, 1H), 7,44–7,53 (m, 1H), 8,13 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, d ppm):** 22,5, 27,8, 41,4, 123,9, 126,1, 126,6, 132,5, 132,9, 143, 171,2.

Резултати елементалне микроанализе за **S-изобутил тиосалицилну киселину**

$$M(C_{11}H_{14}O_2S) = 210,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	62,83	15,25	6,71
Нађено:	62,48	15,53	6,31

S-изоамил тиосалицилна киселина (L3): температура топљења 89°C, бели прах. **IR (KBr, cm⁻¹):** 3778, 3661, 3059, 2954, 2923, 2868, 2851, 2650, 2554, 1943, 1808, 1683, 1586, 1561, 1465, 1432, 1412, 1385, 1367, 1350, 1314, 1303, 1284, 1269, 1255, 1170, 1149, 1118, 1061, 1046, 954, 907, 809, 785, 749, 737, 703, 651, 559, 527, 491, 480, 459.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, d ppm): 0,97 (d, 6,4 Hz, 6H), 1,58–1,71 (m, 2H), 1,74–1,90 (m, 1H), 2,91–2,98 (m, 2H), 7,15–7,23 (m, 1H), 7,33–7,37 (m, 1H), 7,45–7,54 (m, 1H), 8,14 (dd, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H). **¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, d ppm):** 22,3, 27,8, 30,3, 37,1, 123,8, 125,8, 126,3, 132,5, 133, 143,1, 171,4.

Резултати елементалне микроанализе за **S-изоамил тиосалицилну киселину**

$$M(C_{12}H_{16}O_2S) = 224,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	64,25	14,29	7,19
Нађено:	63,87	14,50	6,98

3.2.2. Припрема бакар (II)-комплекса са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине, $[Cu_2(S\text{-}i\text{pr}\text{-thiosal})_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$ (C1)

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,4139 mmol) бакар(II)–нитрат трихидрата у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје (0,1623 g, 0,8278 mmol) S-изопропил дериват тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама се додаје раствор литијум-хидроксида (0,0198 g, 0,8278 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Раствор је филтриран и упарен до мале запремине. Након тога је издвојен плаво-зелени талог филтрацијом, испиран водом и сушен на ваздуху. Кристали погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спором кристализацијом из матичног воденог раствора. Принос: 0,3248 g (83,15 %). Моларна проводљивост: $8,59 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$. $\mu(294 \text{ K}) = 1,79 \text{ } \mu\text{V}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3789, 3699, 3432, 3054, 2964, 2924, 2865, 2624, 1677, 1615, 1587, 1555, 1510, 1459, 1436, 1402, 1366, 1310, 1282, 1257, 1235, 1167, 1152, 1113, 1065, 1052, 1041, 938, 876, 847, 810, 797, 751, 720, 698, 661, 624, 553, 525, 500, 459.

Резултати елементалне микроанализе за $[Cu_2(S\text{-}i\text{pr}\text{-thiosal})_4(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$,

$$M(Cu_2C_{40}H_{52}O_{12}S_4) = 980,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	49,01	13,09	5,35
Нађено:	49,33	13,34	5,19

3.2.3. Припрема бакар (II)–комплекса са S-изобутил дериватом тиосалицилне киселине, $[Cu_2(S\text{-}i\text{bu}\text{-thiosal})_4(H_2O)_2]$ (C2)

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,4139 mmol) бакар(II)–нитрат трихидрата у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје (0,1739 g, 0,8278 mmol) S-изобутил дериват тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама се додаје раствор литијум-хидроксида (0,0198 g, 0,8278 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Раствор је филтриран и упарен до мале запремине. Након тога је издвојен модрозелени талог филтрацијом, испиран водом и сушен на ваздуху. Принос: 0,3311 g (79,99 %). Моларна проводљивост $9,9 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$. $\mu(294 \text{ K}) = 1,81 \text{ } \mu\text{V}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3778, 3444, 3060, 2954, 2925, 2868, 2650, 2196, 1684, 1606, 1561, 1465, 1434, 1400, 1367, 1314, 1282, 1269, 1255, 1197, 1168, 1150, 1114, 1062, 1046, 956, 917, 847, 809, 786, 740, 721, 696, 652, 625, 556, 539, 526, 515.

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{Cu}_2(\text{S-ibu thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$,

$$M(\text{Cu}_2\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{S}_4) = 1000,26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	52,83	12,82	5,64
Нађено:	52,57	13,01	5,33

3.2.4. Припрема бакар (II)–комплекса са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-iam-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C3)

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,4139 mmol) бакар(II)–нитрат трихидрата у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје (0,1855 g, 0,8278 mmol) S-изоамил дериват тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама се додаје раствор литијум-хидроксида (0,0198 g, 0,8278 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Раствор је филтриран и упарен до мале запремине. Након тога је издвојен модрозелени талог филтрацијом, испиран водом и сушен на ваздуху. Принос: 0,3569 g (81,62 %). Моларна проводљивост $16,92 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mol}^{-1}$. $\mu(294 \text{ K}) = 1,85 \mu\text{В}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3790, 3433, 3054, 2956, 2926, 2868, 2184, 1593, 1550, 1462, 1436, 1401, 1385, 1281, 1258, 1239, 1157, 1112, 1062, 1044, 957, 846, 805, 786, 743, 717, 695, 657, 616, 603, 551, 526, 513, 499.

Резултати елементалне микроанализе за $[\text{Cu}_2(\text{S-iamthiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$,

$$M(\text{Cu}_2\text{C}_{48}\text{H}_{64}\text{O}_{10}\text{S}_4) = 1056,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	54,58	12,40	6,11
Нађено:	54,73	12,14	6,33

3.3. Рендгенска кристалографија монокристала

Кристали комплекса бакра(II) са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине добијен је спором кристализацијом из матичног воденог раствора. На тај начин издвојени су плаво-зелени кристали комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-ipr-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, C1. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за комплекс бакар(II) са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине C1 приказани су у табели 1. Прикупљање података је обављено на *SuperNova* дифрактометру *Rigaku OD* опремљеном са *Atlas2 CCD* детектором. *CrysAlisPro* је коришћен за прикупљање података и такође за пречишћавање ћелија, смањење података и корекцију апсорпције (95). Структура је решена помоћу *SHELXT* и *Fourier* синтеза је урађена употребом *SHELXL* и имплементирана у програмском пакету *WinGX*.

Анизотропски дислокацијски параметри су прочишћени за све не-водоничне јоне. Угљеником везани водоникови атоми су постављени у прорачунате положаје и пречишћени на родитељским С атомима. Н атоми молекула воде укључени у водоничне везе су пронађене у Фуриер-овој мапи разлика и прецизирани моделом јахања. Геометријска анализа извршена употребом *SHELXL DIAMOND* (99) је коришћен за молекуларну графику.

Табела 1. Сажетак података о кристалима и пречишћавању структуре за C1.

	C1
Емпиријска формула	C ₄₀ H ₅₂ Cu ₂ O ₁₂ S ₄
Формула масе	980.13
<i>T</i> [К]	95(2)
λ [Å]	1.54184
Кристални састав	триклински
Просторна група	<i>P</i> -1
Димензије јединичне ћелије [Å, °]	<i>a</i> = 9.5846(2) α = 85.1550(10) <i>b</i> = 10.695(2) β = 87.6090(10) <i>c</i> = 11.4601(2) γ = 69.977(2)
Волумен [Å ³]	1099.12(4)
ρ ; густоћа (израчуната) [g.cm ⁻³]	1; 1.481
Коефицијент апсорпције [mm ⁻¹]	3.466
<i>F</i> (000)	510
Облик кристала, боја	призма, светло плава
Величина кристала [mm ³]	0.103x0.078x0.039
θ Распон за прикупљање података [°]	3.871-74.545
Распон индекса	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11, -13 ≤ <i>k</i> ≤ 13, -14 ≤ <i>l</i> ≤ 14
Рефлексија скупљена / независна	30364 / 4448 [<i>R</i> (int) = 0.0259]
Подаци / ограничења / параметри	4448 / 0 / 262
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.058
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>RI</i> = 0.0303, <i>wR2</i> = 0.0765
<i>R</i> индекси (сви подаци)	<i>RI</i> = 0.0330, <i>wR2</i> = 0.0795
Највећа разлика између врха и рупе	1.122 и -0.614

3.4. Испитивање интеракција комплекса са ДНК апсорпционом методом

У циљу одређивања јачине интеракције комплекса са молекулом ДНК, одређена је интризична константа везивања, K_b , апсорпционом спектроскопском анализом раствора који садржи константну концентрацију комплекса ($10 \mu\text{M}$) и различиту концентрацију ДНК ($0\text{-}50 \mu\text{M}$). Апсорпција је мерена у опсегу између $200 - 500 \text{ nm}$. Пуферски раствор ($0,01 \text{ M PBS}$, $\text{pH} = 7,2$) коришћен је као медијум при овим мерењима. Вредност за константу везивања (K_b) одређена је применом Волф-Шимерове једначине (1):

$$[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [\text{ДНК}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad (1)$$

у којој је $[\text{ДНК}]$ концентрација ДНК, ϵ_a екстинкциони коефицијент комплекса при датој ДНК концентрацији, ϵ_f и ϵ_b су екстинкциони коефицијенти само комплекса и комплекса када је комплетно везан за ДНК. Однос $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ и $[\text{ДНК}]$ је линеаран, где $1/(\epsilon_f - \epsilon_b)$ и $1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$ представљају нагиб и одсечак. Вредност за K_b израчунава се из односа нагиба и одсечка.

3.5. Испитивање интеракција комплекса са ДНК флуориметријском методом

Интеракције комплекса са ДНК испитиване су и применом флуоресцентне спектроскопије у присуству етидијум бромида (ЕВ) да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕВ из његовог ДНК-ЕВ комплекса. Комплекс ДНК-ЕВ је припремљен мешањем $10 \mu\text{M}$ ЕВ и $10 \mu\text{M}$ ДНК у $0,01 \text{ M}$ раствору PBS пуфера. Испитивана је промена интензитета флуоресцентног емисионог спектра ДНК-ЕВ комплекса са додатком растућих концентрација комплекса. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини екситације од 527 nm , а флуоресцентне емисије на 612 nm , у опсегу таласне дужине од 550 до 750 nm .

Добијени спектрални подаци анализирани су применом Стерн-Волмерове једначине (2) у којој су I_0 и I интензитети емисије у одсуству и у присуству комплекса, $[Q]$ је концентрација комплекса, а K_{SV} је константа смањења („гашења”) флуоресценције. Вредност за K_{SV} израчунава се из односа нагиба и одсечка линеарне зависности I_0/I у односу на $[Q]$.

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

3.6. Испитивање интеракција комплекса са ДНК мерењем вискозности

Промена вискозитета ДНК раствора мерена је у присуству растуће концентрације комплекса. Подаци су представљени као $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у односу на r , где је η вискозитет ДНК раствора у присуству комплекса, а η_0 вискозитет само ДНК раствора у пуферу (PBS).

Вредности вискозитета израчунате су мерењем времена за које раствор који садржи ДНК протекне кроз капилару (t), кориговано са временом протока само пуферског раствора (t_0), $\eta = (t-t_0)/t_0$. Сваки узорак је анализиран три пута и израчуната је средња вредност времена протока.

3.7. Испитивање интеракција комплекса са BSA флуориметријском методом

Флуоресценција протеина је последица природних флуорофора као што су триптофан, тирозин и фенилаланин. Промене флуоресценције BSA коришћене су за изучавање интеракције са Cu(II) комплексима C1-C3. Експерименти гашења флуоресценције триптофана су спроведени коришћењем 2 μ M BSA у PBS пуферу. Праћено је гашење интензитета емисије остатака BSA триптофана на 363 nm у присуству растућих концентрација комплекса C1-C3 (0-20 μ M). Емисиони спектри су снимљени у опсегу 300–500 nm са ексцитацијом на 295 nm. Опсег ексцитације и емисије били су 10 nm. Добијени резултати су анализири применом Стерн-Волмерове једначине (2) а константа гашења флуоресценције (K_{sv}) израчуната је из нагиба графика линеарне зависности I_0/I у односу на $[Q]$.

3.8. Ћелијске културе

У истраживањима су коришћене ћелијске линије мишјег карцинома колона СТ26 (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CRL-2638*), добијене из карцинома колона индукованог код BALB/C миша применом N-нитрозо-N-метилуретана; мишјег *Lewis* карцинома плућа LLC1 (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CRL CRL-1642*), добијеног из плућа C57BL/6 миша коме је имплантиран *Lewis* карцинома; хуманог карцинома плућа A549 (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CCL-185*) и хуманог колоректалног карцинома HCT116 (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CCL-247*) и SW480 (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CCL-228*). Коришћена је и линија нормалних хуманих фибробласта MRC-5 (*American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CCL-171*). Све ћелије су гајене у комплетном DMEM медијуму (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са 10% феталног телећег серума (FBS, енгл. *Fetal Bovine Serum*), 2 mmol/l L-глутамин (енгл. *L-glutamine*), 100 U/mL пеницилина, 100 μ g/mL стрептомицина и 1 mmol/l мешаних неесенцијалних аминокиселина (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*), у асептичним условима у инкубатору на 37°C са 5% CO₂.

Непосредно пре експеримената, субконфлуентне ћелије (~85%), у логаритамској фази раста, одвајне су са дна флашка краткотрајним третирањем раствором 0,25% трипсина у трајању од 1 минута. Ћелије су затим опране у комплетном медијуму, а затим центрифугиране на 125 x g 10 минута. Вијабилност ћелија је одређивана бојењем трипан плавим. Само она ћелијска суспензија која садржи више од 95% вијабилних

ћелија коришћена је у експериментима. LLC1 ћелије које су слабо адхерентне, одвајане су са дна флашка без употребе трипсина.

3.9. МТТ тест

Ћелијске суспензије, добијене на претходно описан начин, густине 3×10^4 ћелија/ml, сипане се у микротитар плоче са 96 бунара у запремини од 100 μ l. Након инкубације од 24 часа у стандардним условима, медијум је одливен, а ћелије су излагане комплексима бакра, у концентрацијском распону од 7.8 μ M до 1000 μ M у временском периоду од 72 сата. Као контролна супстанца коришћена је цисплатина у истим дозама. По истеку 72 сата третирања ћелија супстанцом, течност из свих бунара је одливена и у сваки бунар је додато по 100 μ l медијума са 20% МТТ раствора (5 mg/ml у PBS-у). Плоче су инкубиране наредна 4 часа у стандардним условима. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки отвор је сипано по 150 μ l DMSO-а (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*) и 20 μ l глицинског пуфера (pH 10,5). Оптичка густина одређена је на таласној дужини од 595 nm, на машини *Microplate multimode detector Zenyth 3100*.

Вијабилност ћелија је израчуната помоћу формуле 3:

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E-B)/(K-B) \times 100 \quad (3)$$

Е-ћелије третиране испитиваном супстанцом (апсорбанца); Б-контрола-бленк (апсорбанца); К- нетретиране ћелије (апсорбанца).

Вијабилност ћелија приликом третмана је испитивана у трипликату и у три независна експеримента.

3.10. Кванитативно испитивање апоптотске смрти

У експоненцијалној фази раста ћелије су пресејане у нове флашкове. Када су ћелије достигле конфлуентност 70%, медијум је замењен свежим медијумом са додатком комплекса бакра у концентрацији 50 μ M. Контролне ћелије нису излагане комплексима или цисплатини, само је медијум замењен свежим комплетним медијумом. Након 24 сата изложености, ћелије су опране 2 пута у комплетном медијуму и ресуспендоване у пуферу који омогућава везивање *Annexin-a V* (10X пуфер: 0.1 M HEPES, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) до густине 1.000.000 ћелија/ml. У 100 μ l такве суспензије додато је по 5 μ l *Annexin-a V-FITC* (*BD Pharmingen, San Diego, California, USA*) и 5 μ l PI (PI, енгл. *propidium iodide*) концентрације 50 μ g/ml PBS-а. После истека 15 минута инкубације на собној температури у мраку, у сваки узорак је додато по 400 μ l 1X пуфера за везивање. Анализирано је 20000 догађаја на *FACS Calibur flow cytometer* (*BD Biosciences, San Jose, USA*), а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (*Tree Star*). Сматра се да су *Annexin V* (-) PI (-) ћелије живе, *Annexin V* (+) PI (-) ћелије су у раним фазама апоптозе, *Annexin V* (+) PI (+) су у касним фазама апоптозе, а *Annexin V* (-) PI (+) су некротичне ћелије.

3.11. Анализа ћелијског циклуса

За анализу процентуалне заступљености испитиваних ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса коришћен је *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* кит (*Thermo Fisher Scientific, Inc. USA*). Ћелије су након постизања 70-80% конфлуентности у флашковима третиране комплексом бабра или цисплатином као контролном супстанцом у концентрацијама од 50 μM у периоду од 24 часа у стандардним условима. Као контролне ћелије коришћени су флашкови у којима је медијум замењен свежим медијумом у исто време кад су осталим флашковима додати комплекси односно цисплатина. Након истека инкубације, ћелије су опране у комплетном медијуму и у 0,5 ml ћелијске суспензије додато је 1 μl *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* боје, затим су узорци инкубирани 30 минута на температури од 37°C, у мраку, и анализирани коришћењем проточног цитометра *FACS Calibur flow cytometer* (*BD Biosciences, San Jose, USA*), а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (*Tree Star*). Сваки узорак је рађен у трипликату.

3.12. Анализа експресије Ki-67 молекула проточном цитометријом

Након инкубационог периода од 24 сата у присуству испитиваних једињења, цисплатине или чистог медијума (контрола), ћелије су опране хладним PBS-ом, а затим фиксиране и пермеабилисане коришћењем *Fixation and Permeabilization Kit-a* (*BD Biosciences*). Након тога ћелије су су инкубирани са примарним антителом обележеним флуорохромом (FITC), 20 минута на температури од 4°C. Након тога ћелије су опране у *BD Perm/Wash™ Buffer-y* (*BD Biosciences*), центрифугиране и ресуспендоване у 250 μl пуфера за бојење и анализирани на проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences, San Jose, USA*). Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* програма (*Tree Star*). Сваки узорак је рађен у трипликату.

3.13. Методе за испитивање антитуморске активности комплекса *in vivo*

3.13.1. Експерименталне животиње

Истраживања су спроведена мишевима чистог соја BALB/C старости од 8 до 12 недеља. У испитивања су укључене животиње усклађене старости и телесне масе. Мишеви су одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Животиње су чуване према прописаним узгојним условима (храна и вода за пиће *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла). Спроведено истраживање одобрила је Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-8665 од 17.07.2017. године.

3.13.2. Еспериментални модел карцинома колона

Хетеротопски модел карцинома колона индукован је субкутаном применом 1×10^6 СТ26 ћелија у 50 μ l DMEM-а у дорзалну регију миша. Од тринаестог дана након апликације туморских ћелија мишеви су примали комплекс бакра (II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, као контролна супстанца коришћена је цисплатина, а трећа група мишева третирана је само физиолошким раствором. Суспензије су примењиване интраперитонеално у дози од 5 mg/kg, ресуспендовановано у 100 μ l физиолошког раствора (0,9% NaCl), три пута недељно у току две недеље. Свака група бројила је 10 мишева. Мишеви су жртвовани 24 дана након апликације туморских ћелија.

Раст примарног тумора праћен је свака три дана, регистрањем палпабилног тумора, а његова величина одређивана је коришћењем нониуса. Запремина тумора је израчунава по формули 4:

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

(4)

Хистопатолошка анализа метастаза

Мишеви су жртвовани 24. дана експеримента цервикалном дислокацијом. За хистопатолошку анализу коришћени су примарни тумор, плућа и јетра.

3.13.3. Израда патохистолошких препарата и верификација броја и величине метастатских колонија

Непосредно након екстирпације, ткива јетре и плућа су фиксирана у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени резони дебљине 5 μ m. Добијени парафински исечци су депарафинисани загревањем и потапањем у ксилол, а затим и алкохол опадајућих концентрација, рехидратисани су и обојени хематоксилин еозином. После бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације употребљене су растуће концентрације алкохола. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*BX51, Olympus, Japan*). Метастатске колоније су верификоване у плућима и јетри BALB/C мишева. Одређиван је просечан број метастаза по у ткиву јетре и ткиву плућа сваког миша.

3.13.4. Анализа експресије гена у ткиву примарног тумора методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену

За изолацију укупне РНК из исечака ткива примарног тумора коришћен је тризол реагенс (енгл. *TRIReagent® Solution, AppliedBiosystems, Fostercity, CA, USA*). Ткиво је механички хомогенизовано у 1 ml тризола коришћењем ручног хомогенизатора, а потом центрифугирано 10 минута на 12000 rpm на 4°C. У супернатант је додато 100 µl бромхлорпропана (*SigmaAldrich, Germany*) након чега су узорци вортексовани и инкубирани 15 минута на собној температури, а затим центрифугирани 20 минута на 12000 rpm на 4°C. Након центрифугирања, горња водена фракција у којој се налази РНК, је пажљиво пребачена у нове епрувете у које је додато и 500 µl расхлађеног изопропил алкохола. Узорци су благо вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и затим центрифугирани 8 минута на 12000 rpm на 4°C. После одливања супернатанта талог у којем се налази РНК је опран два пута у трајању од 5 минута на 7500 x g у 1 ml 70% етанола и сушен до испаравања целокупног етанола. Осушени талог је растворен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water, Applied Biosystems*).

Након изолације, урађена је реверзна транскрипција изоловане РНК коришћењем кита *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, FosterCity, California, USA)*. Експресија гена мерена је методом ланчане полимеризације у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR, qRT-PCR*) коришћењем кита *Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific™)*. За реакцију qRT-PCR коришћен је апарат *Mastercycler® eprealplex (Eppendorf, Hamburg, Germany)*. Коришћени прајмери наведени су у Табели 2.

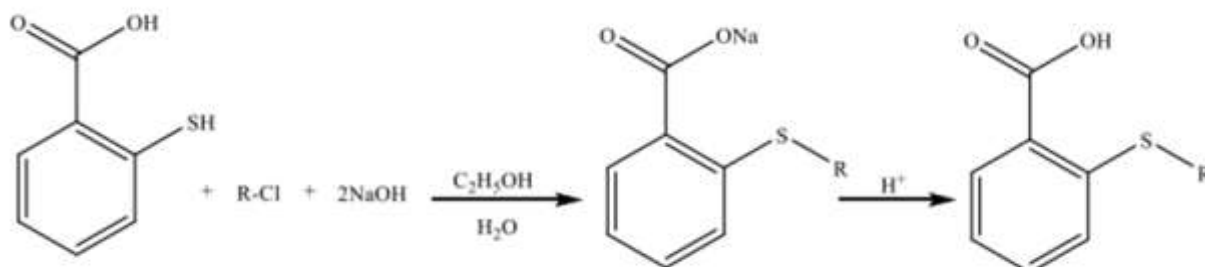
Табела 2. Прајмери коришћени у експериментима.

	Sense (5' to 3')	Antisense (5' to 3')
Mouse Bax	ACACCTGAGCTGACCTTG	AGCCCATGATGGTTCTGATC
Mouse Caspase-3	AAATTC AAGGGACGGGTCAT	ATTGACACAATACACGGGATCTGT
Mouse Cyclin D3	CCGTGATTGCGCACGACTTC	TCTGTGGGAGTGCTGGTCTG
Mouse Nanog	AAGCAGAAGATGCGGACTGT	GTGCTGAGCCCTTCTGAATC
Mouse C-Myc	CGGACACACAACGTCTTGGA	AGGATGTAGGCGGTGGCTTTT
Mouse Oct4	CAAGGCAAGGGAGGTAGACA	ATGAGTGACAGACAGGCCAG
Mouse Sox2	AAAGGGTTCTTGCTGGGTTT	AGACCACGAAAACGGTCTTG
Mouse ICAM-1	CAATTTCTCATGCCGCACAG	AGCTGGAAGATCGAAAGTCCG
Mouse VCAM-1	TGAACCCAAACAGAGGCAGAGT	GGTATCCCATCACTTGAGCAGG
Mouse TNF-α	CCACATCTCCCTCCAGAAAA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
Mouse IL-1β	TCTTTGAAGTTGACGGACCC	TGAGTGATACTGCCTGCCTG
Mouse GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Синтеза и хемијска карактеризација

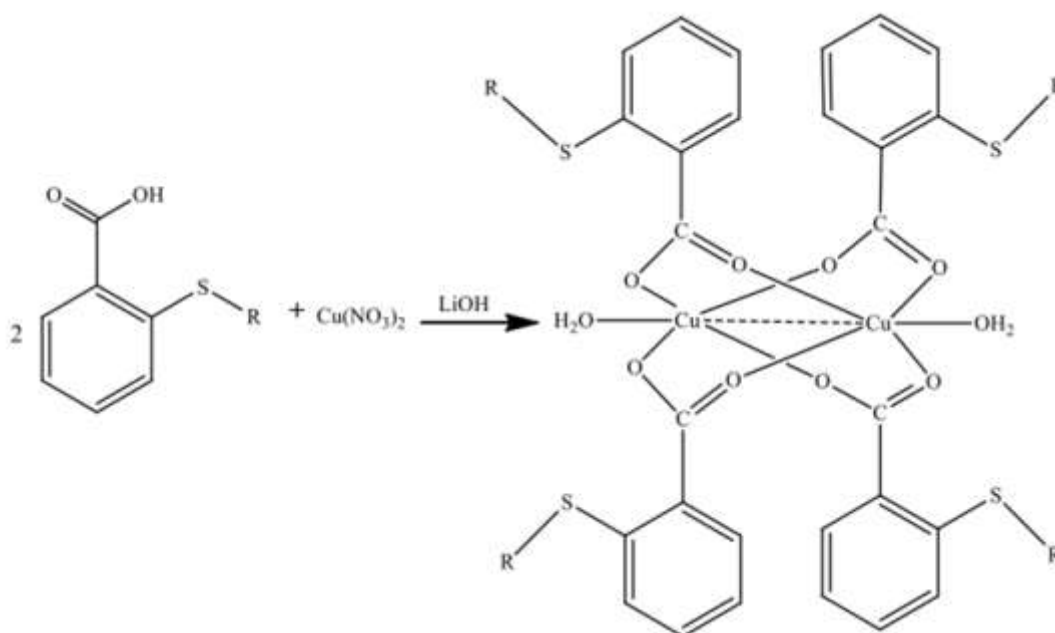
S-изоалкил (R = изопропил-(L1), изобутил-(L2), изоамил-(L3)) деривати тиосалицилне киселине припремљени су методом алкиловања тиосалицилне киселине помоћу одговарајућих изоалкил-хлорида у алкалном раствору вода-етанол (Шема 1).



R = изопропил-(L1), изобутил-(L2), изоамил-(L3)

Шема 1. Метода синтезе S-изоалкил деривата тиосалицилне киселине.

Одговарајући комплекси бакар(II) [Cu₂(S-R-thiosal)₄(H₂O)₂] су добијени директном реакцијом Cu(NO₃)₂ са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине у молском односу 1:2 уз додатак еквимоларне количине воденог раствора литијум-хидроксида (Шема 2).



R = изопропил-(C1), изобутил-(C2), изоамил-(C3)

Шема 2. Синтеза комплекса бакар(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине.

За снимање инфрацрвених спектра коришћена је техника КВг пилуле. На основу резултата инфрацрвене спектроскопије протврђено је формирање комплекса бакар(II)

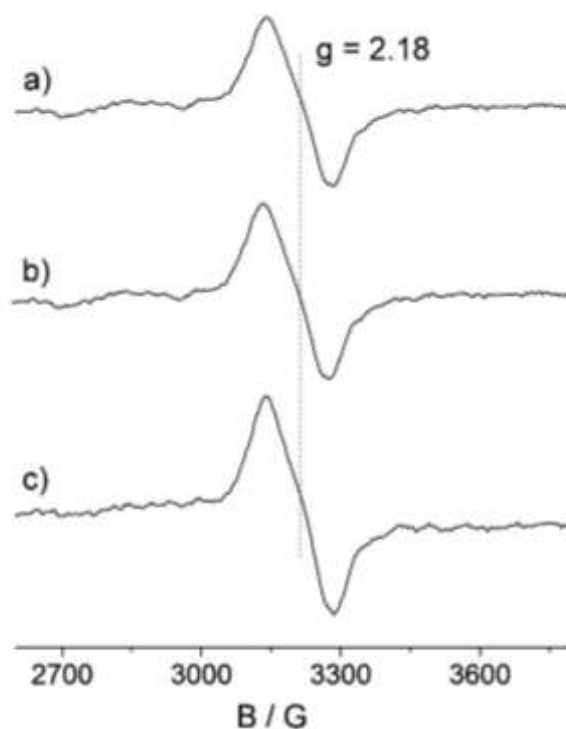
са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине. У Табели 3 дате су најважније траке у инфрацрвеним спектрима изолованих бидентатних лиганата (**L1**, **L2**, **L3**) и одговарајућих бакар(II) комплекса (**C1**, **C2**, **C3**). Инфрацрвени спектри наведених комплекса потврђују бидентатно координовање S-изоалкил деривата тиосалицилне киселине преко два атома кисеоника карбоксилних група за бакар(II)-јон. Асиметричне валенционе вибрације карбоксилних група изолованих лиганата (1677cm^{-1} за (**L1**), 1679cm^{-1} за (**L2**), 1683cm^{-1} за (**L3**)) су уочене на нижим вредностима од очекиваних ($1700\text{--}1750\text{cm}^{-1}$) што би се могло објаснити присуством велике R-S групе у *orto* положају. Положаји ових трака у одговарајућим комплексима (**C1-C3**) налазе се у очекиваној области ($1600\text{--}1650\text{cm}^{-1}$) (1615 и 1587cm^{-1} за (**C1**), 1606 и 1561cm^{-1} за (**C2**), 1593 и 1550cm^{-1} (**C3**)) што потврђује њихово депротоновање и координовање за метал. На основу анализе инфрацрвених спектра могу се уочити траке симетричних валенционих вибрација карбоксилних група S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II). Наведене траке су уочене у очекиваној области око 1400cm^{-1} (96, 97). На основу анализираних инфрацрвених спектра S-изоалкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II) потврдили смо да је дошло до координовања за јон метала, али стварна структура комплекса није могла бити потврђена (95). Стварна структура комплекса и грађење бинуклеарних комплекса бакра(II) потврђено је на основу резултата рендгенске структурне анализе комплекса бакра(II) са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине.

Табела 3. Најважнији инфрацрвени опсежи (cm^{-1}) испитиваних једињења.

Једињење	-S-R	-COO ⁻ (as)	-COO ⁻ (sim)
S-i-pr-thiosal	690 (y)	1677	1404
[Cu ₂ (S-i-pr-thiosal) ₄ (H ₂ O) ₂]	698 (y)	1615 (j), 1587 (j)	1402
S-i-bu-thiosal	689 (y)	1679	1412
[Cu ₂ (S-i-bu-thiosal) ₄ (H ₂ O) ₂]	696 (y)	1606 (j), 1561 (j)	1400
S-i-am-thiosal	703 (y)	1683	1412
[Cu ₂ (S-i-am-thiosal) ₄ (H ₂ O) ₂]	695 (y)	1593 (j), 1550 (j)	1401

j-јако, у-умерено

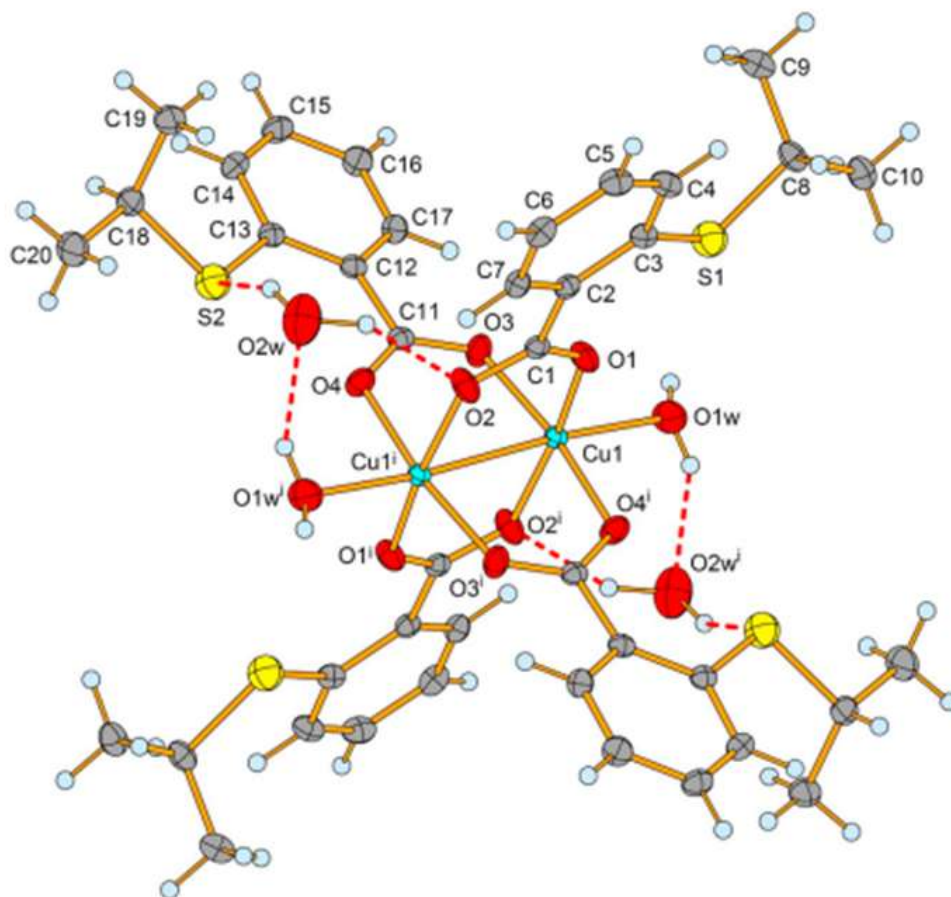
На Фигури 1 приказана је собна температура EPR спектра испитиваних бакар (II)-комплекса у 1% DMSO/H₂O (*aqua*) (v/v). Сви спектри су готово изотропни ($g=2.18$, $\Delta H=140\text{G}$), без решене хиперфине спреге ($S = 1/2$, $I = 3/2$) што указује на исту координацију бакар (II)-јона у сва три комплекса. Забележени су слични спектри за хидрирана бинуклеарна једињења бакра, са бакар (II)-јонима координираним кисеоничким лигандима. Забрањена транзиција на пола поља ($\Delta M_s = \pm 2$) није откривена, што указује да су бакар (II)-јони нису магнетно повезани.



Фигура 1. Собна температура X-бендова EPR спектра 0.5 mM Cu(II) комплекса у 1% DMSO/H₂O (v/v); a) Cu(II) комплекс са S-isopropyl дериватом тиосалицилне киселине, [Cu₂(S-*ipr*-thiosal)₄(H₂O)₂] (**C1**), b) Cu(II) комплекс са S-isobutyl дериватом тиосалицилне киселине, [Cu₂(S-*ibu*-thiosal)₄(H₂O)₂] (**C2**) и c) Cu(II) комплекс са S-isoamyl дериватом тиосалицилне киселине, [Cu₂(S-*i-am*-thiosal)₄(H₂O)₂] (**C3**). Експериментални услови EPR укључивали су: фреквенцију микроталаса 9.85 GHz, снагу микроталаса 5 mW, модулација амплитуде 5 G, модулација фреквенције 100 kHz.

4.2. Рендгенска структурна анализа комплекса [Cu₂(S-*ipr*-thiosal)₄(H₂O)₂]·2H₂O (**C1**)

Рендгенска структурна анализа показује да комплекс **C1** кристализује у триклиничком систему са просторном групом *P*-1. Структура молекула и нумерација присутних атома приказани су на Фигури 2.



Фигура 2. Структура комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-ipro-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (C1).

Као што се са слике може видети два јона бабра(II) координовани су за четири молекула *S*-изопропил деривата тиосалицилне киселине и то преко оба атома кисеоника карбоксилних група. На тај начин настаје бинуклеарни комплекс бабра(II).

Рендгенска структурна анализа показује да комплекс **C1** кристализује у триклинички систем са просторном групом *P*-1. Његова молекуларна структура и схема атомског нумерисања приказана је на Фигури 2. Структура **C1** састоји се од неутралног педалаточак типа центросиметричног димер молекула $[\text{Cu}_2(\text{S-ipro-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ и два молекула воде. У димеру, два Cu(II) атома су премошћена преко два пара бидентатних карбоксилатних анјона тако да формирају квадратну базу од четири атома кисеоника (Табела 2) око сваког бабра. Сваки карбоксилат се несиметрично координира са централним атомима са раздаљином Cu–O краћом од око 0,2 Å; просечна удаљеност Cu–O је 1.961(13) Å. Апикалне положаје квадратних пирамидалних бакарних координационих полиедара ($\tau = 0.005$) заузимају атоми кисеоника (O1w) молекула воде са благо издуженом дужином везе у односу на екваторијалне везе (Cu1–O1w = 2.194(2) Å). Због могуће ротације око појединачне везе C1–C2 и C11–C12 у оба карбоксилата, диједрални углови између равни фенолних прстенова и одговарајућих карбоксилних група су 5.6(1) и 11.0(1)°. Ови углови су знатно мањи од посматраних у два блиско повезана Cu(II)-комплекса са *S*-метил и *S*-етил дериватима тиосалицилне киселине (93) (100). Као што се види из транс O–Cu–O угла у C1, који нису линеарни, атоми бабра јесу померени из одговарајућих базалних равни према апикалном атому кисеоника за 0.187(1) Å. Постоји 41 кристална структура типа весла $[\text{Cu}_2(\text{ar-COO})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (ar-COO су

ароматичне карбоксилне киселине) молекули димера прикупљени у *Cambridge Structural Database* (101). Поређењем дужине и углова веза **C1** са одговарајућим подацима у *CSD* структурама, показано је да су дужине и углови везе у **C1** нормални. Одвајање Cu⋯Cu (2.6031(5) Å) у **C1** унутар димера, значајно краће од збира ван дер Ваалсових радијуса Cu и указује на слабу Cu ⋯ Cu интеракцију, такође је типично Cu⋯Cu одвајање у 41 *CSD* структурама између 2.579 и 2.665 Å са просечном вредности 2,63(2) Å.

Одабране дужине и углови веза у [Cu₂(S-*ipr*-thiosal)₄(H₂O)₂] \cdot 2H₂O (**C1**) комплексу дати су у Табели 4.

Табела 4. Одабране дужине веза (Å) и углова (°) за **C1**.

Cu1–O1	1.9545(14)	O3–Cu1–O1	90.25(7)
Cu1–O2 ⁱ	1.9766(14)	O3–Cu1–O4 ⁱ	169.14(6)
Cu1–O3	1.9473(14)	O1–Cu1–O4 ⁱ	88.65(6)
Cu1–O4 ⁱ	1.9650(14)	O3–Cu1–O2 ⁱ	90.55(7)
Cu1–O1w	2.1935(16)	O1–Cu1–O2 ⁱ	168.84(6)
Cu1–Cu1 ⁱ	2.6031(5)	O4 ⁱ –Cu1–O2 ⁱ	88.47(6)
S1–C3	1.768(2)	O3–Cu1–O1w	98.83(6)
S1–C8	1.830(2)	O1–Cu1–O1w	99.62(6)
S2–C13	1.7737(19)	O4 ⁱ –Cu1–O1w	92.01(6)
S2–C18	1.828(2)	O2 ⁱ –Cu1–O1w	91.26(6)
O1–C1	1.253(2)		
O2–C1	1.268(2)		
O3–C11	1.260(2)		
O4–C11	1.259(2)		

Трансформација симетрије која се користи за генерисање еквивалентних атома: $i = -x + 1, -y + 1, -z + 1$.

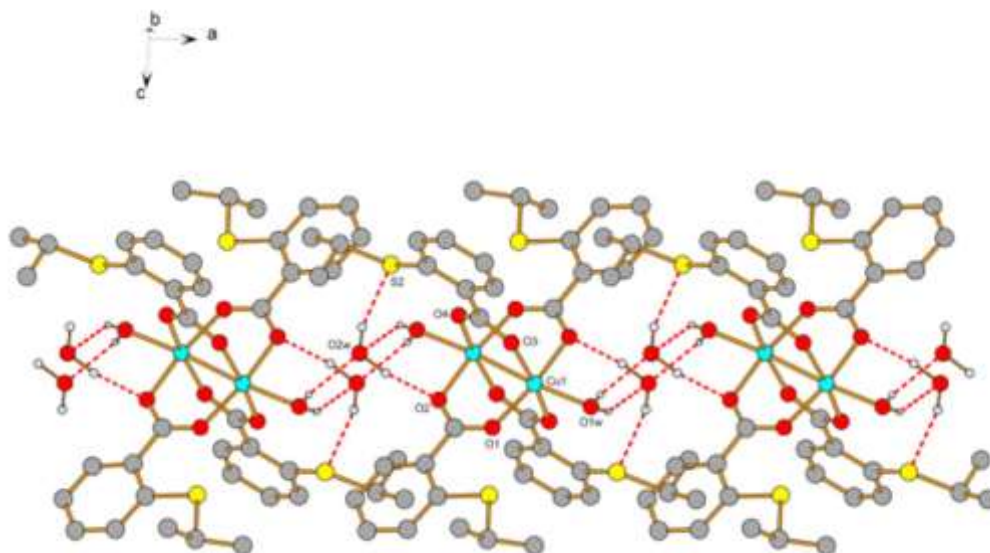
Присутне водоничне везе у молекулу посматраног комплекса приказане су Табели 5.

Табела 5. Водоничне везе за C1 [\AA и $^\circ$]

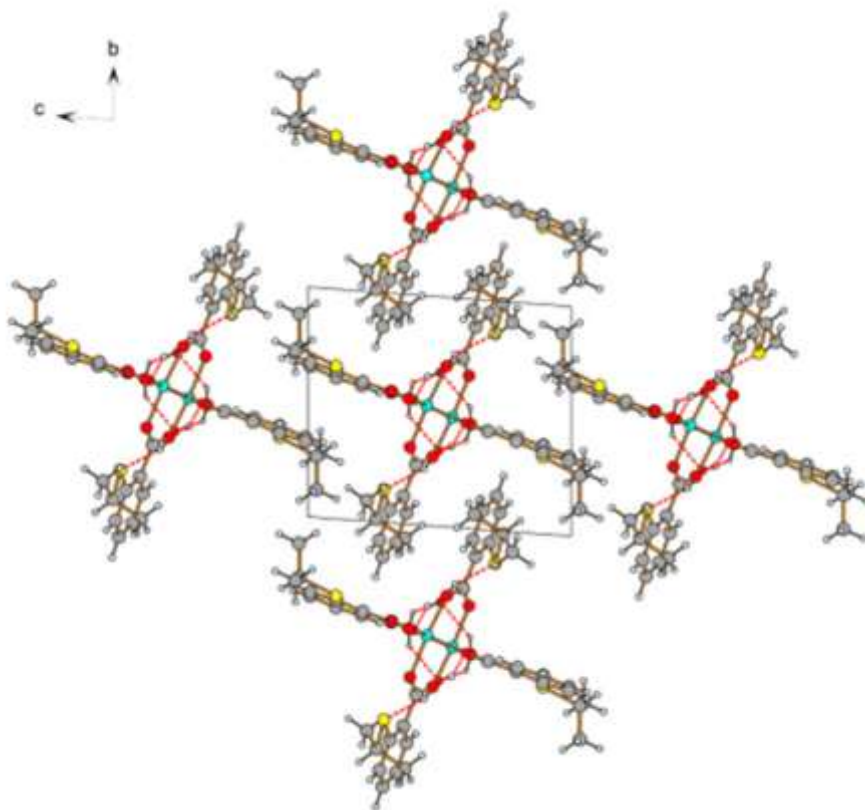
D–H...A	$d(\text{D–H})$	$d(\text{H...A})$	$d(\text{D...A})$	$\angle(\text{DHA})$
O1w–H1O1...O2w ⁱ	0.81	2.11	2.811(3)	144.4
O1w–H2O1...O2w ⁱ	0.92	2.14	2.893(3)	139.0
O2w–H2O2...O2	1.04	1.86	2.836(2)	154.1
O2w–H1O2...S2	1.06	2.25	3.241(2)	154.9

Трансформације симетрије коришћене за генерисање еквивалентних атома: $i = -x + 1$, $-y + 1$, $-z + 1$; $ii = x + 1$, y , z .

Начин паковања молекула комплекса бакра(II) са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине са свим присутним интермолекулским и интрамолекулским водоничним везама приказани су на Фигурама 3 и 4.



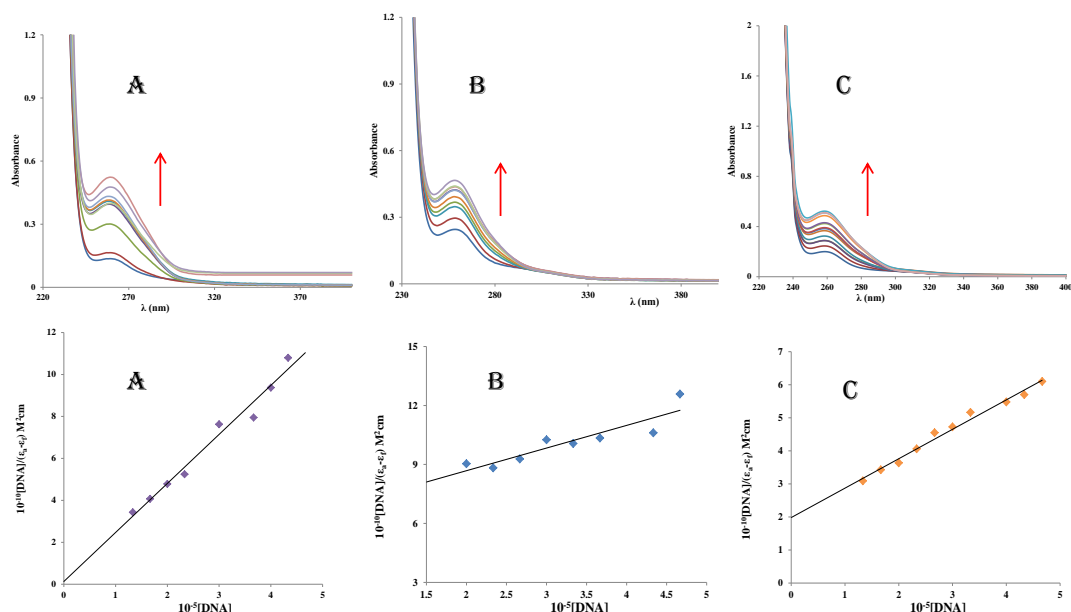
Фигура 3. Ланац паралелан са a осом у кристалној структури C1 показује водоничне везе (црвене испрекидане линије). Атоми водоника који нису укључени у водоничне везе изостављени су ради јасноће.



Фигура 4. Поглед дуж *a* осе који приказује распоред суседних ланаца у структури **C1**. Водоничне везе у ланцима приказане су црвеном испрекиданом линијом.

4.3. Испитивање интеракција комплекса са ДНК апсорпционом методом

С обзиром да ДНК представља потенцијалну биолошку мету за многе антитуморске лекове на бази јона метала, од посебног је значаја испитати начин везивања комплекса са ДНК молекулом. Електронска апсорпциона спектроскопија једна је од метода за одређивање начина и јачине везивања комплекса са ДНК. Комплекси јона прелазних метала могу остварити интеракције са ДНК које могу бити ковалентне (супституција лабилног лиганда у структури комплекса азот-донорском базом из молекула ДНК, нпр. преко *N7* атома гуанина) и/или нековалентне (интеркалација, електростатичко везивање или везивање за мали жлеб) (102). Интензитет апсорпције раствора ДНК у присуству комплекса може се смањити (хипохромизам) или повећати (хиперхромизам), уз повећање апсорпционе таласне дужине (батохромизам). Апсорпциони спектри комплекса **C1**, **C2**, **C3** у присуству ДНК у различитим концентрацијама дате су на Фигури 5. Додатак ДНК у раствор комплекса **C1-C3** показује хиперхромизам (Фигура 5).



Фигура 5. UV-Vis апсорпциони спектри за **C1 (A)**, **C2(B)** и **C3(C)** ($10 \mu\text{M}$) у PBS пуферу (Раствор фосатног пуфера = 0.01 M , $c(\text{NaCl}) = 0.137$, $c(\text{KCl}) = 0.0027 \text{ M}$, $\text{pH } 7.4$) са повећањем концентрације ДНК ($0\text{-}50 \mu\text{M}$). Стрелица приказује хиперхромизам у спектралном појасу. Графички мехови: Графикони $[\text{ДНК}] / (\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ vs. $[\text{ДНК}]$.

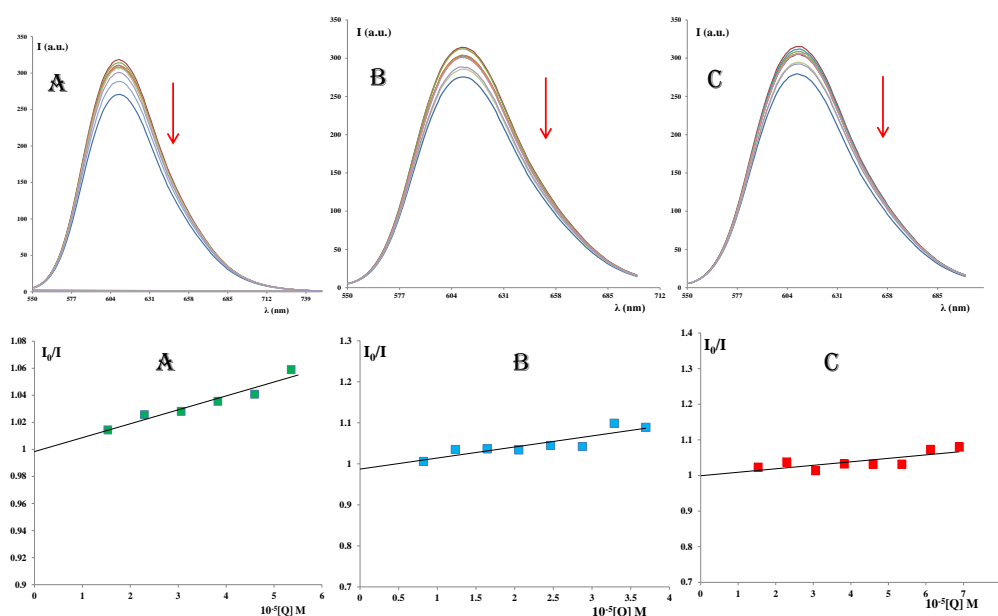
Ово померање хиперхромизма указало је на интеракцију ДНК са комплексима. Уопштено, степен хипохромизма или хиперхромизма који се примећује пружа меру јачине везивања комплекса за ДНК (103, 104). Међу проученим Cu(II) комплексима, **C2** је показао значајан афинитет везивања за ДНК (Табела 6). Равнотежна константа везивања (K_b) између ДНК и сваког од комплекса израчуната је помоћу једначине 1. Штавише, интринзична константа везивања K_b (Табела 6) добијена за проучаване комплексе са ДНК следи редослед **C2 > C1 > C3** што указује на то да **C2** интереагује јаче од осталих комплекса.

Табела 6. Добијене константе за интеракцију између C1-C3 са ДНК у PBS пуферу.

	$K_b [\text{M}^{-1}]$	$K_{sv}[\text{M}^{-1}]$	$K_{bin}[\text{M}^{-1}]$	n
C1	$(4.5 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^3$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^3$	1
C2	$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(2.7 \pm 0.1) \cdot 10^3$	$(6.5 \pm 0.1) \cdot 10^6$	1.7
C3	$(1.7 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^3$	$(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^2$	0.6

4.4. Испитивање интеракција комплекса са ДНК флуориметријском методом

Етидијум бромид емитује интензивну флуоресцентну светлост у присуству ДНК, због јаке интеркалације између суседних ДНК базних парова. Појачана флуоресценција може се значајно смањити додатком комплекса способног да награди јаке интеркалационе везе са ДНК, замењујући ЕВ (105, 106). Експерименти компетитивног везивања су спроведени на ЕВ-ДНК у присуству различитих концентрација Cu(II) -комплекса. Степен флуоресценције ЕВ везаног за ДНК користи се за одређивање степена везивања другог молекула и ДНК (107). Интеракције **C1-C3** са ДНК проучаване су коришћењем раствора у коме је ЕВ везан за ДНК у PBS пуферу ($\text{pH} = 7,2$). Интеракција **C1-C3** са ДНК довела је до гашења интензитета флуоресценције услед истискивања ЕВ из комплекса ЕВ-ДНК. Параметри гашења за **C1-C3** израчунати су помоћу Стерн-Волмерове једначине. Студије замене ЕВ изведене су променом концентрације комплекса метала и праћењем интензитета емисије ЕВ-ДНК комплекса (108). Повећање концентрације **C1-C3** (0–60 μM) показало је значајно смањење интензитета флуоресценције са црвеним помаком (Фигура 6). Индикувано је да је ЕВ ослобођен из комплекса ЕВ-ДНК због његове замене проучаваним комплексима.



Фигура 6. Емисиони спектри ЕВ-ДНК и ЕВ (10 μM) везан за ДНК (10 μM) у присуству различитих концентрација **C1**(А), **C2**(В) и **C3**(С), (λ_{max} око 610 nm). [Стрелица приказује промене интензитета флуоресценције при повећању концентрације **C1**(А), **C2**(В) и **C3**(С), (0-60 μM)]. Графикон испод: *Stern-Volmer* графикони за ЕВ-ДНК флуоресцентну титрацију са **C1-C3**.

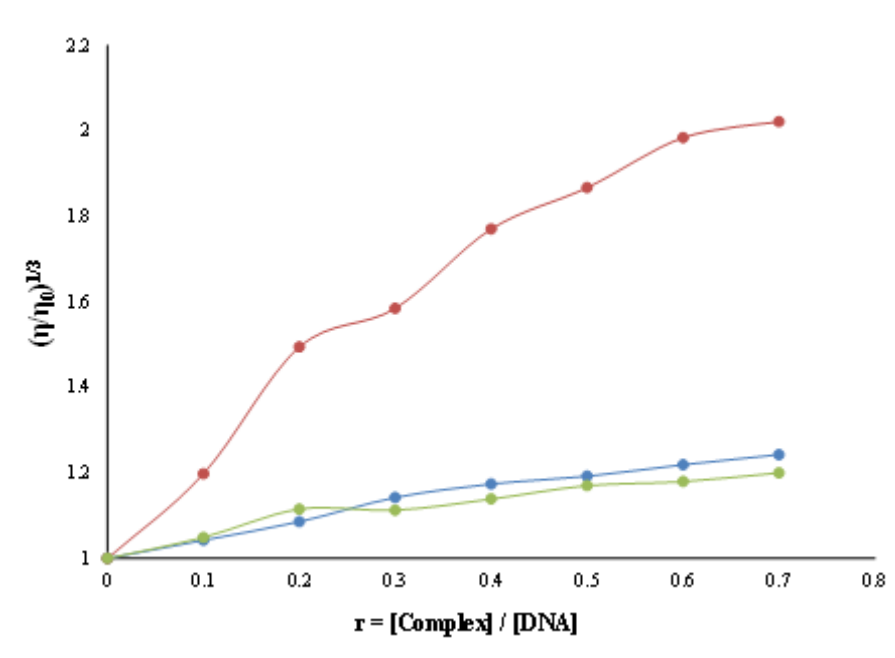
Интензитет флуоресценције на око 610 nm је коришћен за процену K_{sv} (Табела 4). Подаци за гашење флуоресценције се такође могу користити за одређивање места везивања (n) и равнотежне константе везивања K_{bin} помоћу *Scatchard* -ове једначине (109, 110):

$$\log(I_0-I)/I = \log K_{\text{bin}} + n \log[Q] \quad (3)$$

Број места везивања (n) и константа везивања (K_{bin}) израчунати су из графикана зависности $\log(I_0-I)/I$ у односу на $\log[Q]$ (Табела 6). На основу вредности K_{sv} и K_{bin} датих у Табели 6, може се приметити да постоји мала интеракција између коришћених комплекса $Cu(II)$ и ДНК. Комплекс $C2$ има већи афинитет за интеракцију са ДНК од осталих комплекса. Међутим, додаток комплекса у раствор ЕВ-ДНК није значајно угасило (2.5% for $C1$, 8% for $C2$ и 7% за $C3$) интензитет емисије ЕВ везаног за ДНК на око 610 nm (Фигура 6). Добијено мало гашење заједно са малим вредностима K_{sv} јасно је показало да $Cu(II)$ комплекси нису интеркалацијом ступили у интеракцију са ДНК.

4.5. Вискозност

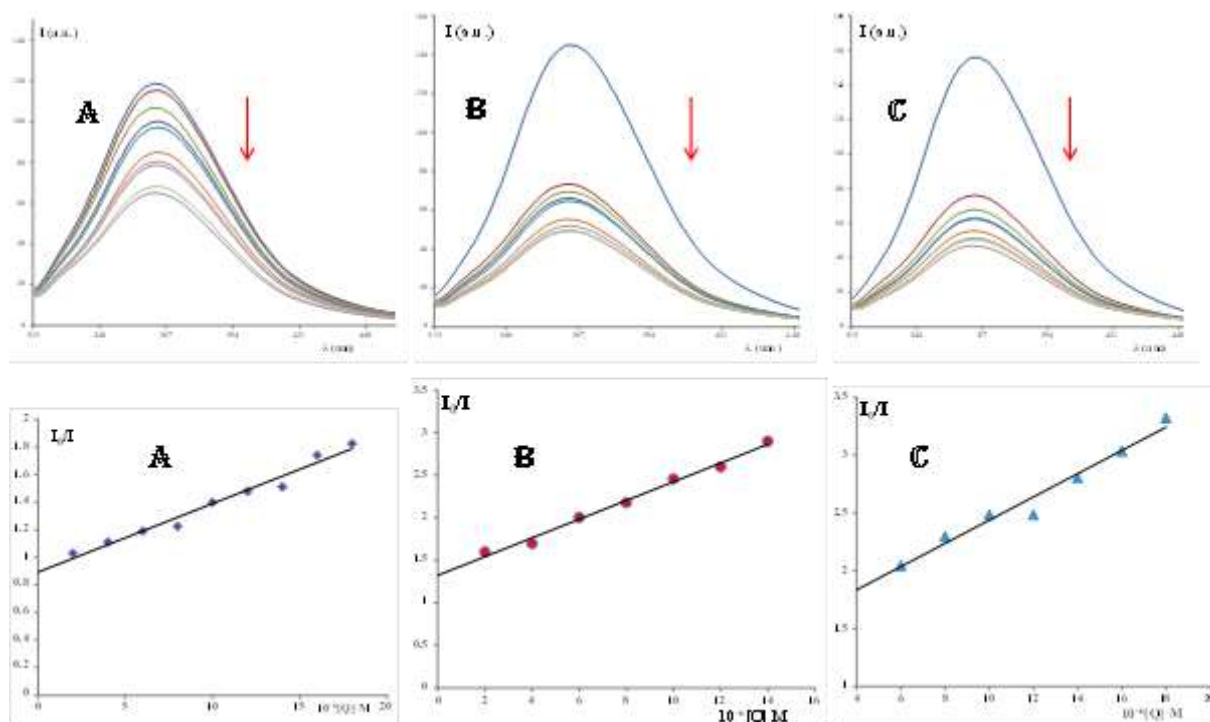
За даље изучавање интеракција између комплекса $C1-C3$ и ДНК, спроведено је мерење вискозности. Класичан модел интеркалације захтева да се спирала ДНК мора продужити јер се парови база раздвајају како би се прилагодили везујућем лиганду, што повећава вискозност ДНК. Етидијум бромид, добро познати интеркалатор ДНК, снажно повећава релативну вискозност продужавањем двоструке спирале ДНК интеркалацијом. Да би се додатно потврдили начини везивања комплекса, мерена је вискозност раствора ДНК у присуству и одсуству ових комплекса. У класичној интеркалацији, комплекси резултирају продужавањем и учвршћивањем двоструке спирале ДНК, што повећава вискозност ДНК (111, 112). Са додатком већих концентрација (све до $r = 1.0$) $C1-C3$ у раствор ДНК (0.01 mM) уочено је повећање релативног вискозитета ДНК (Фигура 7), који је био израженији додавањем комплекса $C2$, док су $C1$ и $C3$ показали умерено повећање релативног вискозитета ДНК. Према томе, уочени резултат сугерише да би комплекси могли да ступе у интеракцију са ДНК, што је потврђено UV-Vis мерењима, али је мало вероватно да ће они међусобно деловати интеркалацијом (студије вискозности и етидијум бромида (ЕВ)). Изузетак може бити комплекс $C2$ ако узмемо у обзир резултате вискозности, али ипак добијена константа K_{sv} има ниску вредност.



Фигура 7. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК (0.01 mM) у раствору PBS у присуству комплекса **C1**, **C2** и **C3** у све већим количинама (r).

4.6. Студије везивања протеина

Могући начин биотрансформације и механизам деловања хемотерапеутских агенаса (међу којима су и лекови са металима) може бити интеракција између малих молекула и серумског протеина (113). Говеђи серумски албумин BSA (ед енгл. *Bovine serum albumin*) се често бира као модел протеина за проучавање интеракције малих молекула са серумским албуминима због његове сличности са албумином хуманог серума (114). Стога, поред проучавања интеракција Cu(II) комплекса са ДНК, даље су испитиване интеракције комплекса C1-C3 са говеђим серумским албумином (BSA). Квалитативна анализа интеракције комплекса C1-C3 са BSA проучавана је испитивањем гашења триптофан флуоресцентног емисионог спектра BSA у присуству комплекса. Флуоресценцију протеина специфично изазивају три аминокиселинска остатка, наиме триптофан, тирозин и фенилаланин. BSA се састоји од два триптофанска остатка дуж његове аминокиселинске секвенце и показује флуоресценцију триптофана при екситацији од 295 nm са максимумом емисије на 365 nm. Афинитет везивања комплекса бакра, **C1**, **C2** и **C3** за BSA, испитиван је применом експеримента гашења флуоресценције триптофана. Флуоресцентна спектроскопија може пратити промене у структури протеина, динамици и савијању (115, 116). Промена флуоресценције BSA након додавања растућих концентрација **C1-C3** (0–20 μ M) у опсегу 300–500 nm (λ_{ex} = 295 nm) приказана је на Фигури 8. Примећено је смањење интензитета флуоресценције на 362, 363 или 364 nm. Подаци за гашење флуоресценције су анализирани помоћу Стерн-Волмерове једначине, једначина 2 и константа гашења (K_{sv}) је израчуната из нагиба графика линеарне зависности I_0/I у односу на $[Q]$.



Фигура 8. Емисиони спектар BSA (2 μM ; λ_{ex} , 295 nm; λ_{em} 365 nm) у присуству растућих концентрација C1 (0-20 μM), $\lambda_{\text{max}} = 365$ nm. Стрелица показује да се интензитет емисије мења повећањем концентрације комплекса C1(A), C2(B) и C3(C). Графикони испод: Графикони зависности I_0/I у односу на $[Q]$.

Резултати приказани у Табели 7 показују да су константе гашења за C2 и C3 сличне, а способност гашења C2 и C3 је два пута већа од комплекса C1. Константа гашења комплекса опада у редоследу C1 > C3 > C2 (Табела 7) што је слично редоследу константе везивања комплекса са ДНК како је раније примећено (Табела 6). Степен гашења интензитета флуоресценције приписује се мери повезаности комплекса са BSA. Мали молекули се независно везују за скуп места у молекулу протеина, а равнотежа између слободног и везаног молекула дата је *Scatchard*-овом једначином (110) једначина (3).

Константа везивања (K_{bin}) и број места везивања (n) добијени су из графикана зависности $\log(I_0-I)/I$ у односу на $\log[Q]$. Међутим, комплекс C2 показује 106 пута већи афинитет везивања од комплекса C1, док комплекс C1 показују 103 пута већи афинитет везивања од C3, како је приказано из њихових константи везивања K_{bin} (Табела 7). Константа везивања комплекса према BSA такође је следила исти редослед који је примећен за константу гашења (Табела 7). Такође је утврђено да је стехиометрија везивања BSA са Cu(II) комплексима већа за комплекс C2 од других комплекса (Табела 7).

Табела 7. Параметри везивања C1, C2 и C3 комплекса за BSA.

Комплекс	$K_{\text{sv}}[\text{M}^{-1}]$	$K_{\text{bin}}[\text{M}^{-1}]$	n
C1	$(5.9 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(7.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	1.5
C2	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^{12}$	2.6
C3	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(2.2 \pm 0.1) \cdot 10^3$	0.6

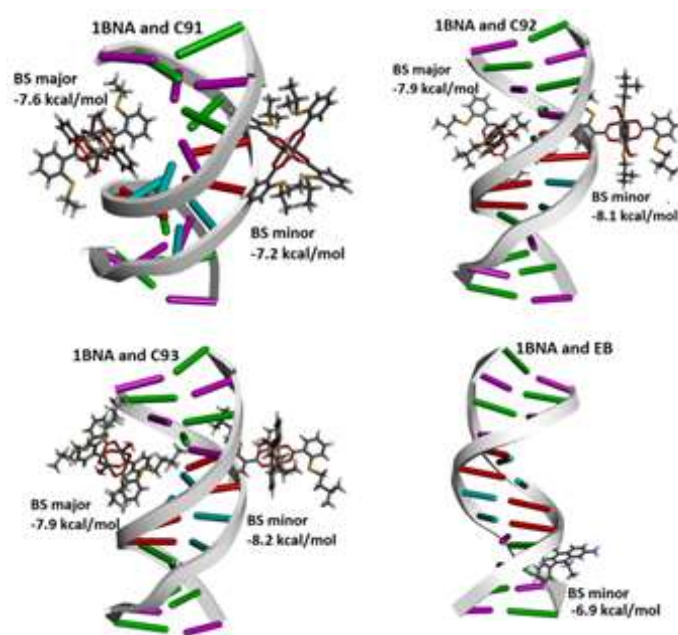
4.7. Студије докинга

Студија докинга тежи да обухвати две различите врсте ДНК структура. Један тип би био обичан двоструки ланац који не садржи ниједно место интеркалације (pdb код: 1BNA). Друга врста ДНК структуре била би двострука спирала са једном или две интеркалационе празнине. У зависности од парова база који чине место интеркалације, постоје различити облици структура ДНК модела. Користили смо различите структуре ДНК модела у прорачунима молекулског докинга како бисмо се испитали могуће интеракције између комплекса и ДНК. Структуре ДНК модела у којима место интеркалације садржи два G-C пара (pdb код: 1XRW) или један A-T и један G-C пар (pdb код: 193D), пронађене су у протеинској бази података, *Protein Data Bank (PDB)*.

Овде ће бити речи о резултатима прорачуна најрепрезентативнијих структура ДНК модела.

Везивање за структуру ДНК без места интеркалације (pdb код: 1BNA): Сва три комплекса везана су за мањи и већи жлеб, али са различитим афинитетом (Табела 8, Фигура 9). Прво место везивања за комплекс C1 налази се у великом жлебу (енергија везивања од -7.6 kcal/mol), јер се комплекс C2 налази у мањем жлебу (енергија везивања од -8.1 kcal/mol), и опет комплекс C3 преферира везивање мањих жлебова (енергија везивања од -8.2 kcal/mol). Интеракције комплекса се углавном остварују кроз прстен најближи ДНК структурама (Фигура 9). Друго место везивања за комплекс C1 налази се у мањем жлебу (енергија везивања од -7.2 kcal/mol), док је за комплекс C2 и C3 у већем жлебу (енергије везивања од -7.9 kcal/mol у оба случаја).

Девет најстабилнијих оријентација (9 завоја) добијено је као резултат прорачуна за сваки комплекс метала. Прве четири оријентације комплекса C1 позициониране су у великом жлебу, што указује на благу предност у везивању великог жлеба. C2 комплекс се подједнако добро веже у оба жлеба наизменично, са благим афинитетом према везивању мањег жлеба (5 завоја за везивање за већи жлеб и 4 завоја за везивање мањег жлеба), док комплекс C3 показује снажан афинитет према везивању мањег жлеба (8 завоја за везивање великог жлеба). Очигледно, волуминознији лиганди преферирају везивање мањих жлебова.



Фигура 9. Најстабилнији адукти ДНК двоструког ланца (PDB код 1BNA) са комплексима Cu(II) (C1, C2 и C3) и етидијум бромидом (EB) на месту везивања за мање (BS мањи) и веће (BS већи) подручје жлебова. Штапићи различитих боја означавају нуклеотидне базе, цитозин је ружичасте, гуанин је зелене, тимидин је црвене и аденин је плаве боје.

Дистрибуција оријентација комплекса метала, као функција афинитета везивања према одређеним регионима или жлебовима на структури 1BNA-DNA, представљена је на Табели 8. За везивање мањег жлеба, све оријентације комплекса метала (18 завоја) налазе се искључиво у чистом G-C региону (9 завоја) или у прелазном региону, између региона парова G-C и A-T (9 оријентација). За везивање главних жлебова (9 завоја),

комплекси метала имају афинитет везивања у прелазном региону (5 завоја) и у региону чистих А-Т парова (3 завоја). Регија чистих А-Т парова у главном жлебу резервисана је искључиво за везивање С2 комплекса.

Табела 8. Афинитет везивања металних комплекса за структуру 1BNA-DNA, одређен енергијама везивања (ΔE_B , у kcal/mol) и бројем оријентација (No).

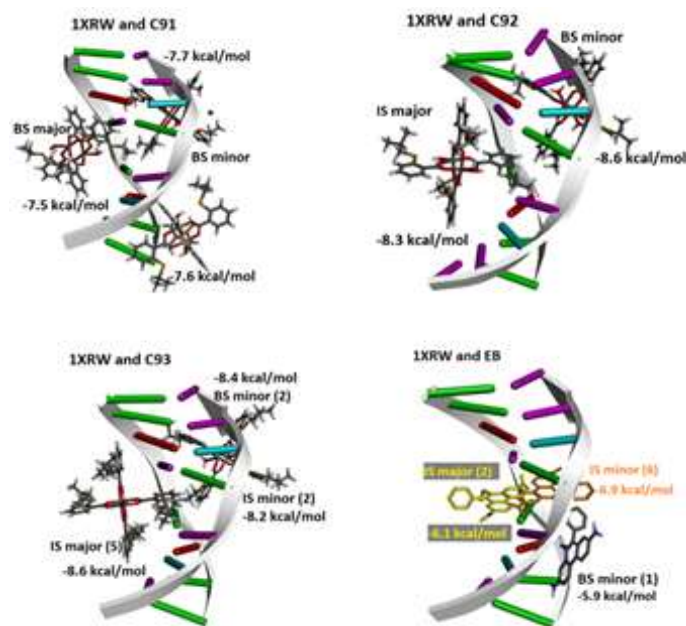
Везивање за жлеб		Лиганд			
		C1	C2	C3	EB
Мали жлеб	ΔE_B	-7.2	-8.1	-8.2	-6.9
	No	5	5	8	9
Велики жлеб	ΔE_B	-7.6	-7.9	-7.9	---
	No	4	4	1	---

* Подебљане вредности енергије везивања указују на најстабилнију оријентацију адукта комплекса метала са 1BNA-DNA структуром.

Како структуре испитиваних комплекса не садрже групе које се сматрају класичним донорским или акцепторским групама за везивање водоника, ове интеракције нису детектоване. Истражујући природу интеракција комплекса метала са ДНК (Табела 8), установљено је да постоје две карактеристичне атрактивне интеракције наведене од најинтензивнијих до најмање интензивних: $\pi \cdots \pi$ и $C-H \cdots \pi$ интеракције. $P=O \cdots \pi$ и $P-O \cdots O$ интеракције су примећене међу најстабилнијим адуктима, као резултат интеракције комплекса са шећерно-фосфатном решетком (11 завоја). $P=O \cdots \pi$ интеракције (као врста анјона $\cdots \pi$ интеракција) су карактеристичније за адукте настале у малом жлебу. Анјон $\cdots \pi$ интеракције у неким системима показују велике енергетске вредности (5-12 kcal/mol) (93), које су у опсегу енергетских вредности за стандардно водонично везивање.

Везивање за ДНК структуру са местом интеркалације (pdb код: 1XRW): Структура ДНК, са празнином између два G-C пара нуклеотида (место интеркалације), издвојена је из кристалне структуре (pdb code: 1XRW) и коришћена као рецептор (Фигура 10). Као што је раније разматрано у студији са регуларним двоструким ланцем ДНК, најбољи резултати везивања су добијени у чистим G-C и прелазним G-C/A-T регионима. Дакле, одговарајуће место интеркалације 1XRW окружено по једним А-Т паром са сваке стране, док се остатак 1XRW структуре састоји од C-G парова. Пошто су прорачуни докинга урађени на целој ДНК, може се очекивати везивање у малом жлебу, у великом жлебу или у пукотини. Табела 9 садржи податке о везивању лиганата (испитивани комплекси метала и EB) за 1XRW-DNA структуру. Равна структура EB лако се интеркалира у 1XRW-DNA пукотину у подручју мањег жлеба. Међутим, интеркалација EB је енергетски повољнија (енергија везивања -6,9 kcal/mol) од везивања мањег жлеба (енергија везивања -5,9 kcal/mol). Конформациона промена 1XRW потпуно обрће тренд везивања између три комплекса у поређењу са трендом везивања 1BNA (структура без празнина). Везивање мањих жлебова сада је карактеристично за комплекс C1 (енергија везивања од -7,7 kcal/mol), док су четири од девет оријентација позициониране у подручју већег жлеба. Комплекс C1 се не интеркалира. Међутим, комплекс C1 се блиско везује за место интеркалације (Фигура

10) и блокира приступ пукотини у подручју малог жлеба (енергија везивања од -7,7 kcal/mol) и главног жлеба (енергија везивања од -7,5 kcal/mol). Комплекс C1 формира интеракције C-H \cdots π са паровима база на месту интеркалације. Додатни контакт са мањим жлебом остварује се интеракцијом комплекса са ДНК-фосфатним групама. Међутим, интеркалација у подручју главног жлеба карактеристична је за комплексе C2 и C3, што се постиже слагањем π - π са азотном базом са енергијом интеркалације од -8,3 kcal/mol и -8,6 kcal/mol. Енергетске разлике између интеркалације и жлебног везивања C2 и C3 комплекса нису значајне (0,3 kcal/mol, односно 0,2 kcal/mol), али је број интеркалираних оријентација знатно већи (Табела 9).



Фигура 10. Најстабилније оријентације Cu(II) комплекса (C1, C2 и C3) и етидијум бромида (EB) на месту везивања подручја мањег жлеба (BS минор), на месту везивања главног жлеба (BS мајор), на месту интеркалације у подручју мањег жлеба (IS минор) и на месту интеркалације у подручју главног жлеба (IS мајор) ДНК која садржи место интеркалације (PDB код: 1XRW). Штапићи различитих боја означавају нуклеотидне базе, цитозин је ружичасте, гуанин је зелене, тимидин је црвене и аденин је плаве боје.

Табела 9. Афинитет везивања комплекса метала за 1XRW-DNA структуру, одређен енергијом везивања (ΔE_B , у kcal/mol) и бројем оријентација (No).

Страна	Везивање за жлеб				Интеркалација				
		C1	C2	C3	EB	C1	C2	C3	EB
Мали жлеб	ΔE_B	-7.7	-8.6	-8.4	-5.9	---	---	-8.2	-6.9
	No	3*+2	3*	2	1	---	---	2	6
Велики жлеб	ΔE_B	-7.5	---	---	---	---	-8.3	-8.6	-6.1
	No	4*	---	---	---	---	6	5	2

Подебљане вредности енергије везивања указују на најстабилнију оријентацију комплекса метала адукта са 1XRW-ДНК структуром.

** Оријентације комплекса у интеракцији са пукотином без интеркалације.*

Разлика у енергијама везивања испитиваних комплекса везаних за 1XRW у односу на оне везане за 1BNA није значајна. Постоји мала разлика у корист 1XRW адукта. Разлика енергије између адуката 1BNA и 1XRW креће се од најнижих вредности за лиганд EB (0 kcal/mol) до највећих вредности за комплекс C2 (0, 5 kcal/mol.) Истовремено присуство EB и комплекса метала у раствору, према горњој дискусији, може имати различите исходе у конкуренцији са комплексима. Нема дилеме око комплекса C1. EB ће се ласко везати јер комплекс C1 има слаб афинитет. Афинитет везивања комплекса C2 (-8.3 kcal/mol) и комплекса C3 за адукте је већа у поређењу са афинитетом који показује EB (-6.9 kcal/mol). Стога је разумно очекивати да ће C2 и C3 бити далеко конкурентнији за интеркалацију у односу на EB. Међутим, комплекс C2 има незнатно већу енергију везивања за мањи жлеб (-8.6 kcal/mol, Табела 9). Може се очекивати да се комплекс C2 делимично интеркалира, а делом веже за мањи жлеб.

Везивање за структуру ДНК са мешовитим местом интеркалације (pdb code: 193D): Докинг студија структуре ДНК без интеркалационог места (pdb код: 1BNA)) показала је да су комплекси метала везани углавном унутар пукотина било у региону бокатом G-C нуклеотидима или у прелазном региону између региона богатих G-C и A-T нуклеотидима. Анализа решених кристалних структура из PDB -а показала је да долази до интеркалационих празнина између G-C парова, или између G-C и A-T парова. Студија докинга структуре ДНК (PDB код: 193D), која садржи две интеркалационе празнине (обе са мешовитим A-T и G-C базним паровима), је такође изведена. Резултати студије су показали да је интеркалација јединствен начин везивања. A-T базни пар додатно стабилизује интеркалацију. Наиме, веће енергије везивања се добијају када се празнине оивиче једним A-T базним паром (193D). Енергије везивања за најстабилнију оријентацију су -8.5 kcal/mol, -9.1 kcal/mol, и 9.2 kcal/mol, за C1, C2, и C3 комплексе. Иако најнижа, чак се и енергија интеркалације за EB благо повећава на -7.0 kcal/mol. Разлика у енергијама везивања између EB и комплекса метала у систему 193D DNA моделу може бити до 2.2 kcal/mol.

Везивање за **EB-DNA** адукте (pdb код: 1XRW): До сада није било експерименталних студија које укључују конкуренцију комплекса метала и EB. Чињеница је да су студије истискивања EB спроведене у раствору адуката EB-DNA. Сходно томе, спроведена је серија студија везивања комплекса метала за адукте EB-DNA (коришћена је структура 1XRW-DNA) како би се стекао потпуни увида у конкуренцију комплекса метала и EB за место интеркалације. Најстабилнији адукт EB-DNA коришћен је као рецептор.

Приступ месту интеркалације 1XRW у подручју главног жлеба није опција за комплексе C1 и C2. Везивање за мањи жлеб адукта EB-DNA погодује и са енергетског и са конформационог аспекта (већи број оријентација). За комплексе C1 и C2, везивање за мањи жлеб је енергетски нешто повољније (енергије везивања од -7,7 kcal/mol и -7,8 kcal/mol) него везивање за регион ДНК са интеркалираним EB (енергије везивања од -7,5 kcal/mol и -7, kcal/mol, респективно), али са конформационог аспекта није повољно (две од 9 оријентација везане су за мањи жлеб). Везивање комплекса C3 за регион са интеркалираним EB фаворизује се са оба аспекта (енергија везивања -8,3 kcal/mol). Поређењем резултата докинга на структури 1XRW-DNA и на адукту EB-DNA, може се закључити да комплекс C1 има сличан афинитет везивања за мањи жлеб и везивања за пукотину (са или без интеркалираног EB). C3 комплекс има сличан афинитет, али

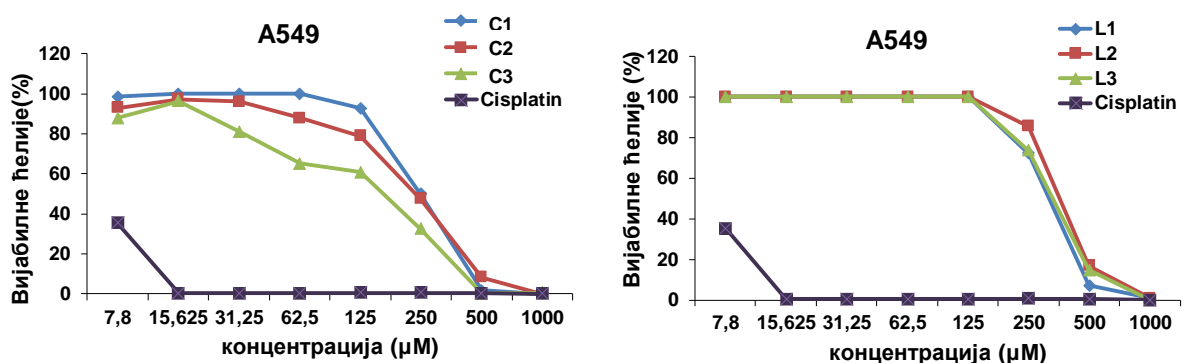
енергетски је интеркалација нешто повољнија од везивања за пукотину са интеркалираним ЕВ (за око 0,3 kcal/mol). Ова разлика је израженија за комплекс С2 (за око 0.6 kcal/mol). Енергија интеркалације (-8.3 kcal/mol) је знатно већа од енергије за везивање за регион са интеркалираним ЕВ (-7.7 kcal/mol), и много јача од енергије интеркалације ЕВ (- 6.9 kcal/mol). Комплекс С2 има потенцијал да замени ЕВ из пукотине и формира енергетски стабилнији адукт С2-1XRW. У поређењу са комплексима С1 и С3, резултати извршених прорачуна указују на то да комплекс С2 има повећану способност интеркалације и замене ЕВ из интеркалационе пукотине 1XRW. То је потврђено и експерименталним резултатима. У студијама замене ЕВ комплекс С2 уклања ЕВ из ДНК (вредности (K_{sv} , K_{bin} и n)). Бољи резултати интеркалације наглашени су већим вредностима релативне вискозности и K_b . И интеркалација и померање ЕВ нису изражене појаве због недовољних енергетских разлика.

4.8. Утицај бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на вијабилност туморских ћелија *in vitro*

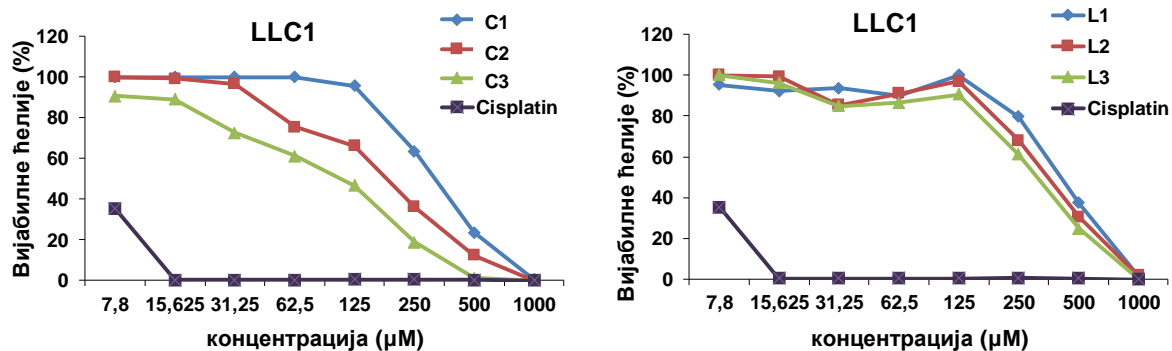
Неситноћелијски карцином плућа и колоректални карцином спадају у канцере са највећом инциденцом у свету. Неситноћелијски карцином плућа је други по реду најчешћи канцер у свету, најчешћи канцер код мушкараца и други по учесталости канцер код жена (117). Колоректални карцином је трећи по реду међу најчесталијим канцерима у свету, трећи по реду најчешћи канцер код мушкараца и трећи најчешћи канцер код жена (118). Имајући у виду ове податке испитали смо потенцијални антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса бакра на ћелијама хуманог и мишјег колоректалног карцинома и хуманог и мишјег неситноћелијског карцинома плућа. За испитивање антитуморског ефекта комплекса бакра коришћене су линије хуманог колоректалног карцинома HCT116 и SW480, мишјег карцинома колона CT26, хуманог аденокарцинома плућа A549 и мишјег *Lewis* карцинома плућа (LLC1). За испитивање евентуалног селективног цитотоксичког ефекта коришћена је ћелијска линија хуманих фибробласта MRC-5. МТТ тест је коришћен за процену ћелијске вијабилности након излагања комплексима бакра, а цисплатина је као стандардни хемотерапеутик, коришћена као контролна супстанца.

Као што се види на Фигури 11 лиганди, S-изоалкилни деривати тиосалицилне киселине немају цитотоксички ефекат на хумане (11А) и мишје (11Б) ћелије карцинома плућа. Сва три лиганда смањују вијабилност хуманих ћелија карцинома плућа, само у највећим концентрацијама, 500 и 1000 μM . (Фигура 11А). Цитотоксички ефекат изоалкил-деривата тиосалицилне киселине на ћелијама *Lewis* карцинома плућа миша био је нешто израженији, минимално смањење вијабилности је уочено од концентрације 32.5 μM (Фигура 11Б).

A

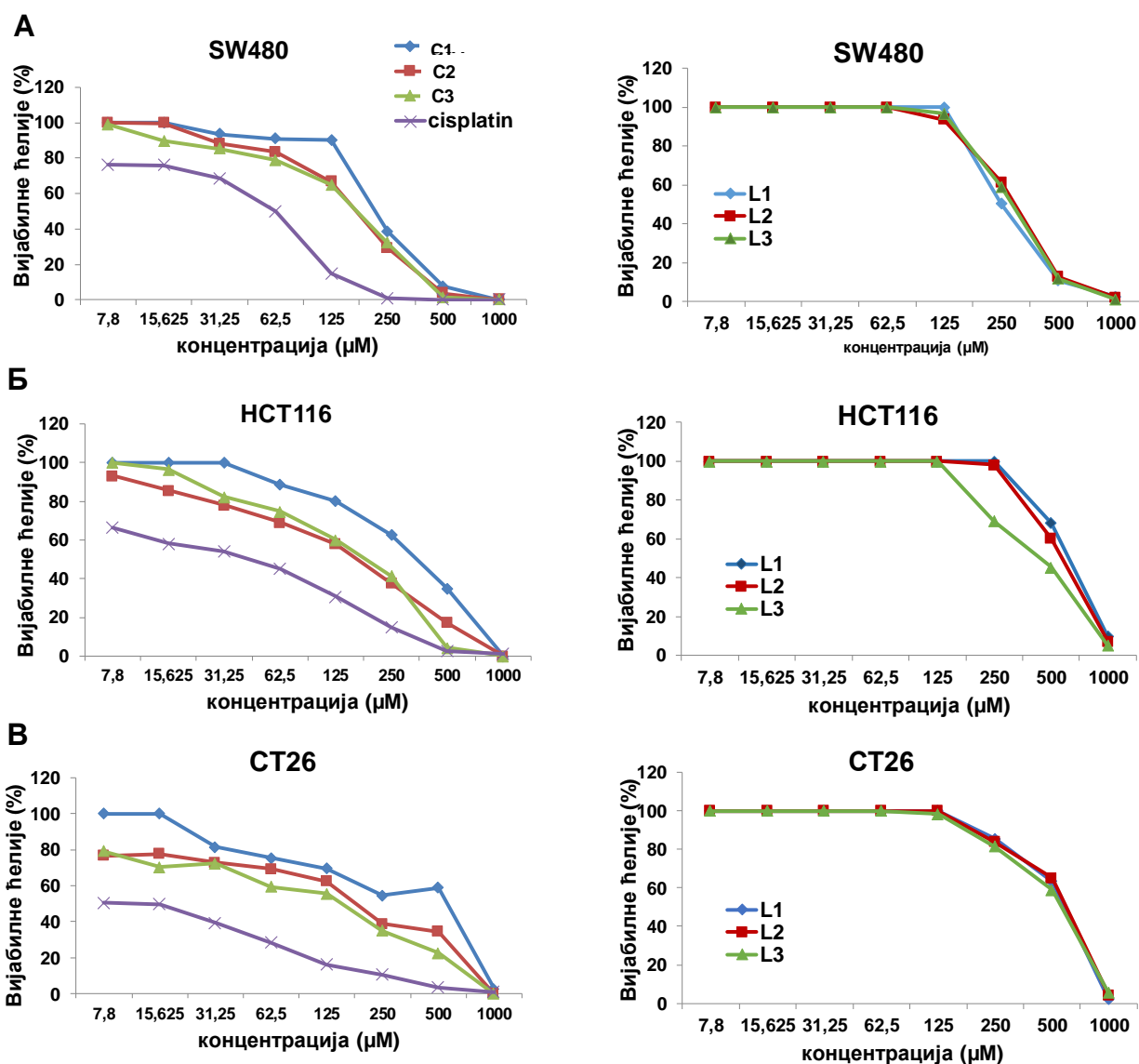


Б



Фигура 11. Цитотоксичност комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и лиганда на А) хуманој (A549) и Б) мишјој (LLC1) линији карцинома плућа после 72 сата излагања (мерено МТТ тестом). Сви подаци су представљени као средње вредности из три независна експеримента изведена у трипликату.

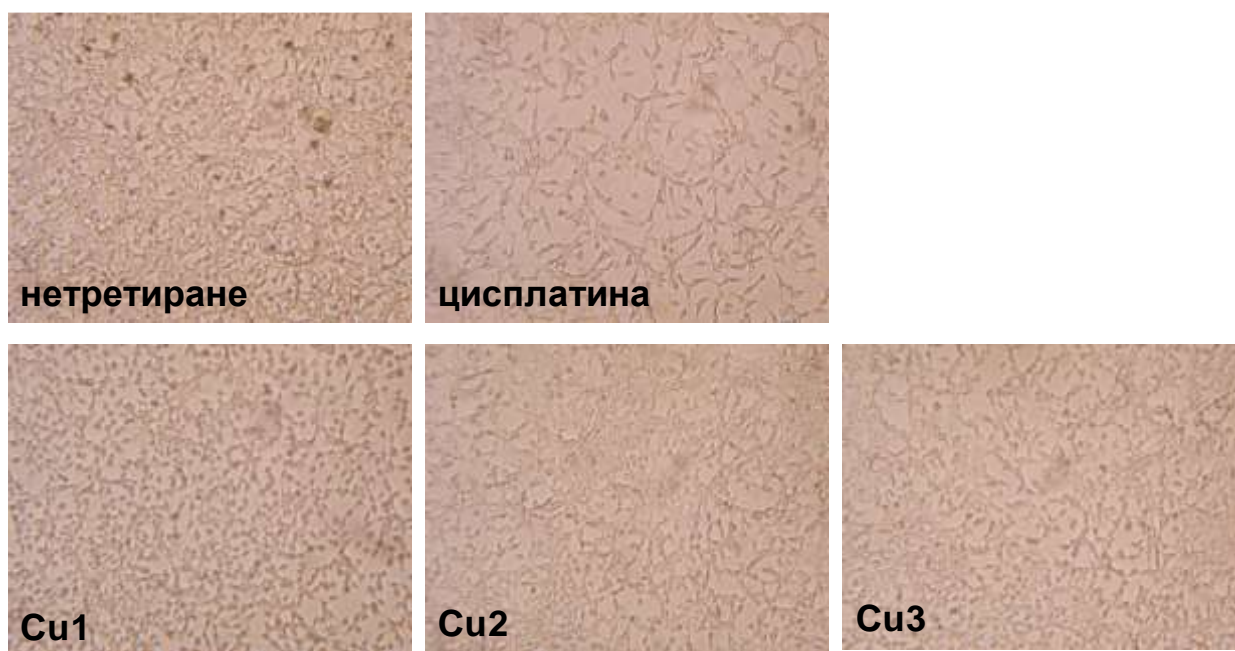
Сви тестирани бакар (II)-комплекси са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине показали су цитотоксички ефекат који зависи од дозе и према A549 и према LLC1 ћелијама, већи у односу на лиганде, али мањи у поређењу са цисплатином (Фигура 11А и 11В).



Фигура 12. Цитотоксичност комплекса бакра(II) са *S*-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и лиганата на хуманим, SW480 (А), HCT116 (Б) и мишјој CT26 (В) линији карцинома колона после 72 сата излагања (мерено МТТ тестом). Сви подаци су представљени као средње вредности из три независна експеримента изведена у трипликату.

Међутим, цитотоксичка активност сва три комплекса бакра(II) са *S*-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на хуманим ћелијама колоректалног карцинома, HCT116 и SW480, била је врло слична активности цисплатине (Фигура 12А и 12Б). Слично ефекту оствареном на мишјим и хуманим ћелијама карцинома плућа, сами лиганди су испољили цитотоксички ефекат на ћелије карцинома колона само у највећим концентрацијама (Фигура 12). Цитотоксичка активност комплекса бакра са *S*-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине је нешто израженија на ћелијама мишјег карцинома колона, CT26, у поређењу са ефектом оствареном на хуманим ћелијским линијама колоректалног карцинома, али и даље нешто слабија у поређењу са ефектом цисплатине (Фигура 12В). Углавном је С3 испољио најбољи антитуморски ефекат на свим тестираним ћелијским линијама (Фигуре 11 и 12).

Морфологија СТ26 ћелија након 24 сата излагања комплексима бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и цисплатини приказана је на Слици 1. Двадесет четири сата након третмана комплексом С1 и цисплатином у концентрацији 62,5 μM евидентан је смањен број ћелија СТ26 које адхерирају за пластику (Слика 1). Нешто мање смањење броја адхерентних СТ26 ћелија се уочава након третмана комплексима С2 и С3. Ови резултати су у складу са резултатима добијеним МТТ тестом (Фигура 12В). Уочава се и да С1 и С3 мењају морфологију СТ26 ћелија, изазивају заокругљивање ових ћелија, и то нарочито С1 (Слика 1).



Слика 1. Морфологија СТ26 ћелија након 72 сата излагања испитиваним комплексима и контролној супстанци.

Анализом IC_{50} вредности израчунатих за испитиване комплексе бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и цисплатине на свим тестираним ћелијским линијама (Табела 10) уочава се да С3 испољава најјачи цитотоксички ефекат на свим тестираним ћелијским линијама. Исто тако, најслабији цитотоксички ефекат показује С1 на свим тестираним ћелијским линијама, следи С2 са бољом активношћу и онда, као што је и поменуто С3 (Табела 10). Бољи цитотоксички ефекти С3 су забележени на мишјим ћелијским линијама карцинома плућа и колоне у поређењу са хуманим. Бољу активност у поређењу са цисплатином С3 је испољио само на ћелијској линији мишјег карцинома колоне СТ26 (Табела 10).

Табела 10. IC₅₀ вредности цитотоксичности комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине (C1-C3) и цисплатине добијене након 72 сата излагања хуманих и мишјих ћелијских линија карцинома колона и плућа одређене МТТ тестом.

Ћелијска линија	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)			
	C1	C2	C3	Цисплатина
A549	267,31±42,24	271,75±58,77	198,19±41,47	5.26±0.81
HCT116	375,52±58,88	221,25±64,21	178,25±32,11	58.19±13.12
SW480	188,52±25,87	172,54±30,18	170,19±42,27	17.31±4.26
LLC1	341,21±57,56	162,32±32,15	74,85±17,54	<7,8
CT26	274,51±47,55	142,47±30,21	53,57±9,54	64,87±6.85

Анализом индекса селективности уочава се да C3 испољава већу цитотоксичност на туморским ћелијама него на ћелијама нормалних фибробласта, индекс селективности је већи од 1 за сваку од испитиваних туморских ћелијских линија (Табела 11). Ако се индекс селективности испитиваних комплекса бакра пореди са индексом селективности контролне супстанце, цисплатине, уочава се да C3 има већи индекс селективности него цисплатина за ћелијску линију мишјег карцинома колона. Овај налаз указује да би C3 евентуално могао да испољи мању токсичност и оштећење органа него цисплатина *in vivo*.

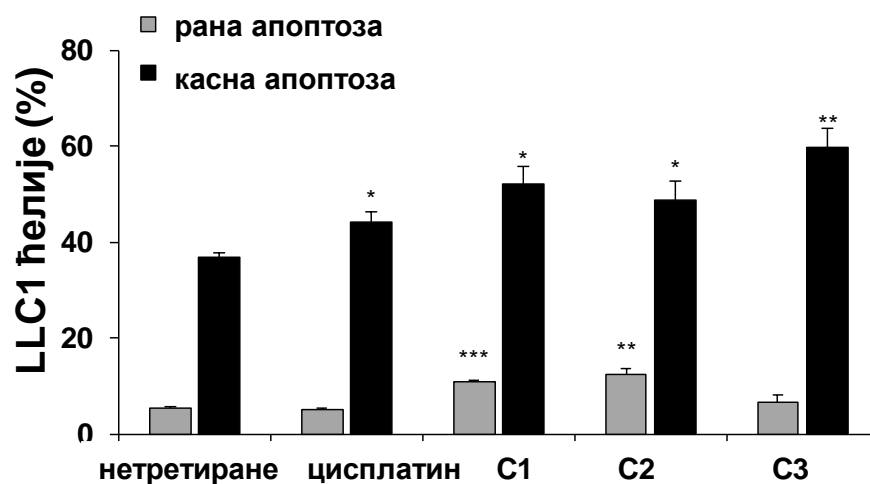
Табела 11. Индекс селективности комплекса бакра и цисплатине на хуманим и мишјим ћелијским линијама карцинома плућа и колона. Индекс селективности је добијен дељењем IC₅₀ вредности за ћелијску линију хуманих фибробласта, MRC-5, односно мишјих фибробласта, 3T3, са IC₅₀ вредношћу за одређену хуману или мишју туморску ћелијску линију.

	Индекс селективности			
	C1	C2	C3	Цисплатина
A549	0,94	0,88	1,20	12.89
HCT116	0,92	1,09	1,34	1,16
SW480	1,84	1,39	1,41	3,74
LLC1	1,01	1,48	3,19	10,81
CT26	1,26	1,69	4,47	1,04

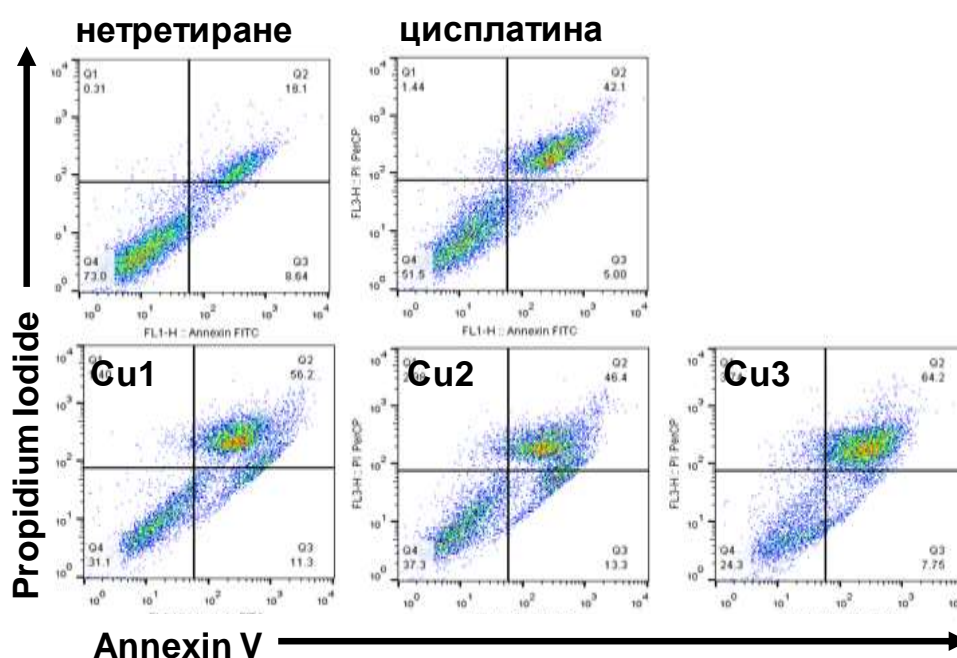
4.9. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине индукују апоптозу туморских ћелија

Потенцијал тестираних комплекса да индукују апоптозу ћелија карцинома колона и плућа је одређиван анализом проточном цитометријом третираних ћелија обојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом. Резултати показују да су сви комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине изазвали су апоптозу ћелија мишјег карцинома плућа, LLC1 (Фигура 13). Знатно већи проценат ћелија LLC1 третираних комплексима C1 ($p < 0.001$) и C2 ($p < 0.005$) у току 24 сата био је у раној апоптози у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 13A). Такође, значајно је већи проценат LLC1 ћелија третираних комплексом C1 ($p < 0.05$), 2 ($p < 0.05$), и 3 ($p < 0.005$) у трајању од 24 сата био у касној апоптози у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 13A). Процент LLC1 ћелија које се након третирања комплексима бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине налазе у раној апоптози је већи од процента ових ћелија након третмана цисплатином (Фигура 13A). Као што је приказано на Фигурама 13A и 13B, већина LLC1 ћелија, после третирања комплексима бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и цисплатином у трајању од 24 сата, је у фази касне апоптозе. Процент рано- и касно- апоптотичних LLC1 ћелија је већи након третирања ових ћелија комплексима бакра(II) него након третирања истом дозом цисплатине, 62.5 μM (Фигура 13A и 13B).

A



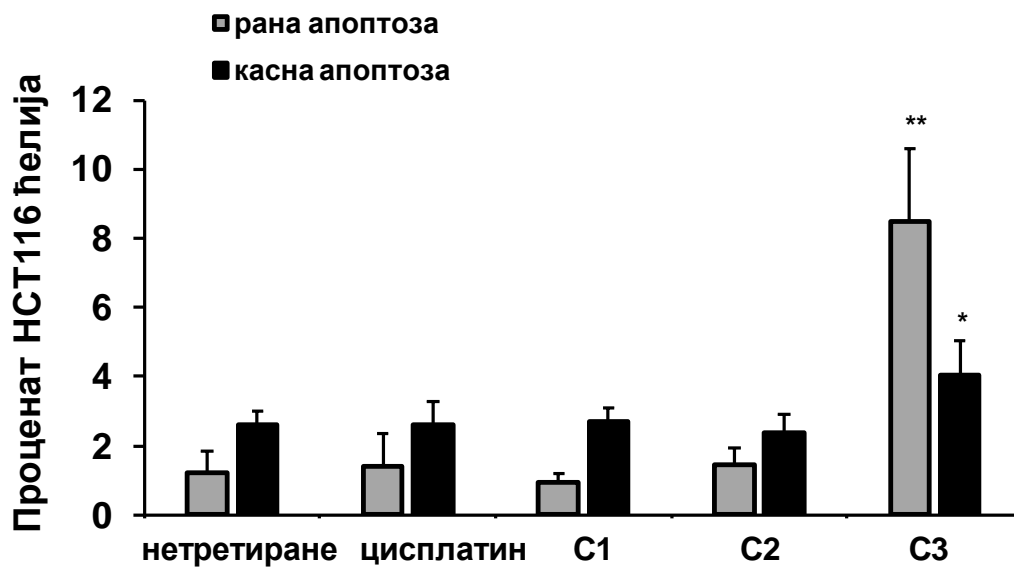
Б

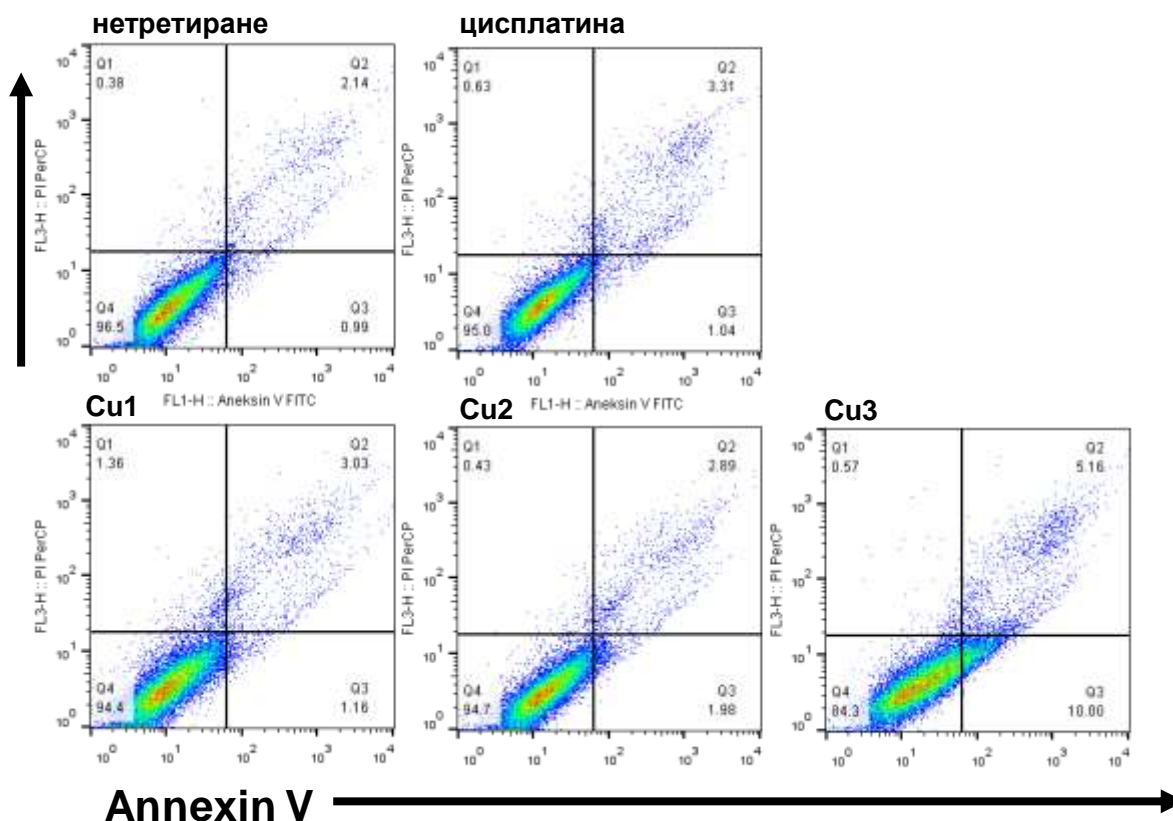


Фигура 13. Комплекси бакара(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине индукују апоптозу ћелија мишијег карцинома плућа. Апоптоза нетретираних и LLC1 ћелија третираних у току 24 сата цисплатином и комплексима бакара(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине у дози 62.5 μM анализирана је проточном цитометријом ћелија обојених Annexin-ом V (FITC) и попидијум јодидом (PI). (A) Подаци су представљени као средње вредности + SD, три независна експеримента, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ указују на разлику између третираних и нетретираних ћелија. (B) Репрезентативни *dot plot*-ови илуструју популацију вијабилних (AnnV- PI-), рано апоптотичних (AnnV+ PI-), касно апоптотичних (AnnV+ PI+) и некротичних (AnnV- PI+) LLC1 ћелија.

У складу са добро познатом ниском цитотоксичком активношћу цисплатине у колоректалном карциному и прилично slabим клиничком одговором на терапију цисплатином код оболелих од колоректалног карцинома (119, 120) је и резултат ове студије у којој је показано да минимални проценат НСТ116 ћелија подлеже апоптози након третмана цисплатином (Фигура 14А). Међутим, С3 је индуковао апоптозу НСТ116 ћелија у значајно већем проценту (Фигура 14А и 14Б). Процент рано- ($p < 0.01$) и касно- апоптотичних ($p < 0.05$) НСТ116 ћелија третираних комплексом С3 (62,5 μM) је статистички значајно већи у поређењу са процентом ових ћелија након третмана истом дозом цисплатине (Фигура 14А). Највећи проценат апоптотичних НСТ116 ћелија детектован проточном цитометријом је у складу са налазом МТТ теста (Фигура 12Б и Табела 10).

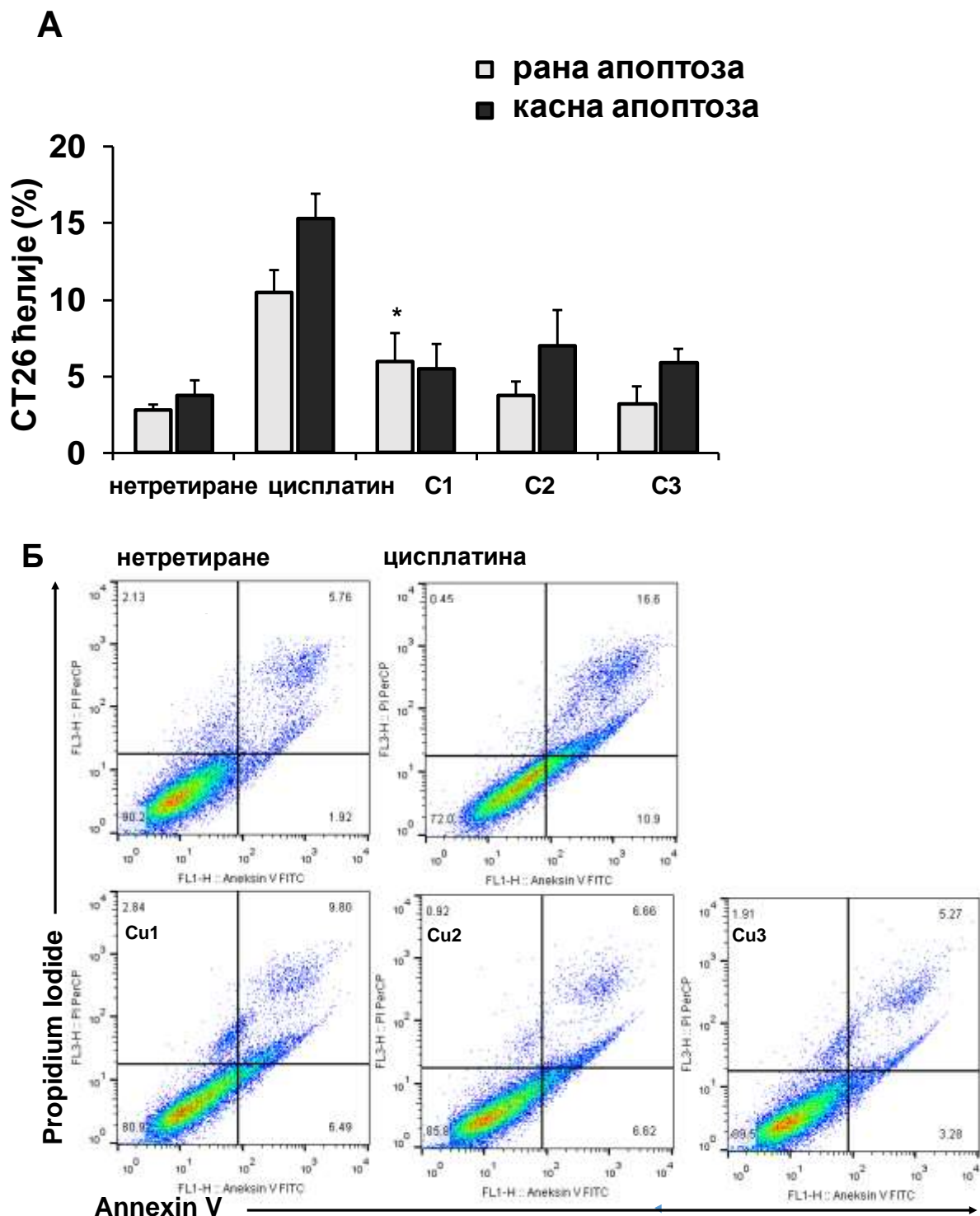
A



Б

Фигура 14. С3 индукује апоптозу ћелија хуманог колоректалног карцинома. Апоптоза нетретираних и НСТ116 ћелија третираних у току 24 сата цисплатином и комплексима бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине у дози 62.5 μM анализирана је проточном цитометријом ћелија обојених Annexin-ом V (FITC) и пропидијум јодидом (PI). (А) Подаци су представљени као средње вредности \pm SD из три независна експеримента. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ указују на разлику између третираних и нетретираних ћелија. (Б) Репрезентативни *dot plot*-ови илуструју популацију вијабилних (AnnV- PI-), рано апоптотичних (AnnV+ PI-), касно апоптотичних (AnnV+ PI+) и некротичних (AnnV- PI+) НСТ116 ћелија.

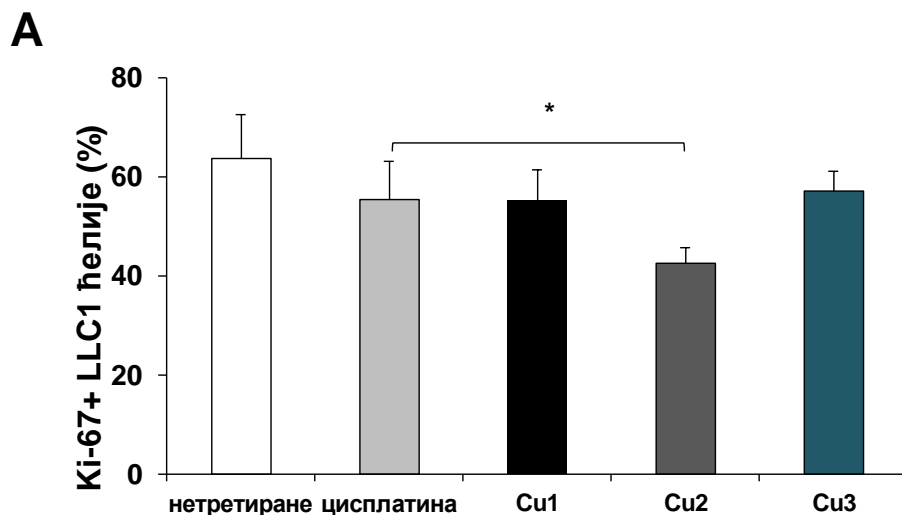
Даље је анализирана способност испитиваних комплекса бакра да изазову апоптотску смрт ћелија мишијег карцинома колона, СТ26. Проценти апоптотских СТ26 ћелија су већи у поређењу са нетретираним ћелијама, али мањи у поређењу са процентим апоптотских СТ26 ћелија третираних цисплатином (Фигура 15А и 15Б). Међутим, статистичка значајност ($p < 0.05$) детектована је само за разлике између процента ћелија које су у раној апоптози и третиране комплексом С1 и нетретираних ћелија (Фигура 15А). Овај резултат је у складу са фазно-контрастном микроскопијом СТ26 ћелија којом је уочено заокруживање СТ26 ћелија у културама третираним комплексом С1 (Слика 1).

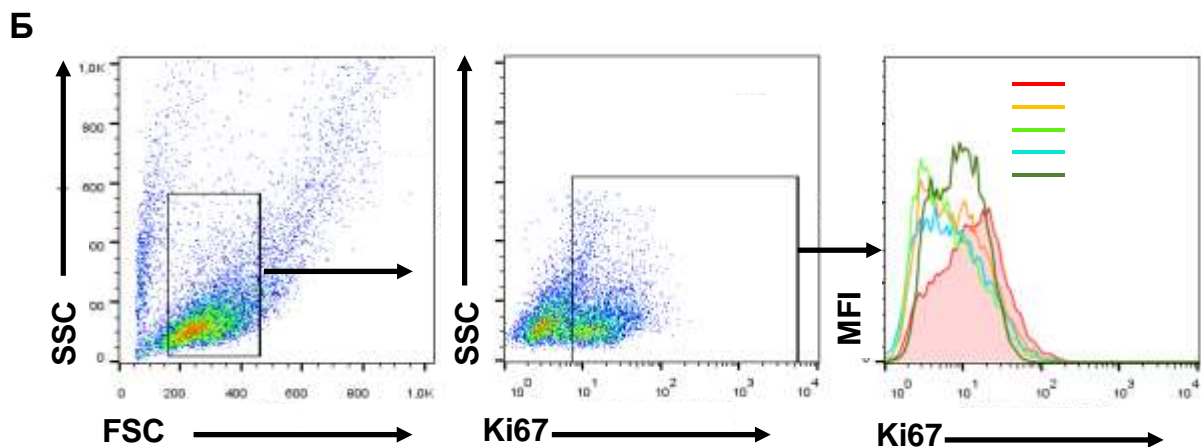


Фигура 15. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине испољавају слаб апоптотски ефекат на ћелије мишјег карцинома колона. Апоптоза нетретираних и СТ26 ћелија третираних у току 24 сата цисплатином и бакар(II)-комплексима у дози 62.5 μM анализирана је проточном цитометријом ћелија обојених Annexin-ом V (FITC) и пропидијум јодидом (PI). (A) Подаци су представљени као средње вредности + SD, три независна експеримента, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ указују на разлику између третираних и нетретираних ћелија. (B) Репрезентативни dot plot-ови илуструју популацију вијабилних (AnnV- PI-), рано апоптотичних (AnnV+ PI-), касно апоптотичних (AnnV+ PI+) и некротичних (AnnV- PI+) СТ26 ћелија.

4.10. Антипролиферативна активност комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на ћелијама колоректалног и карцинома плућа

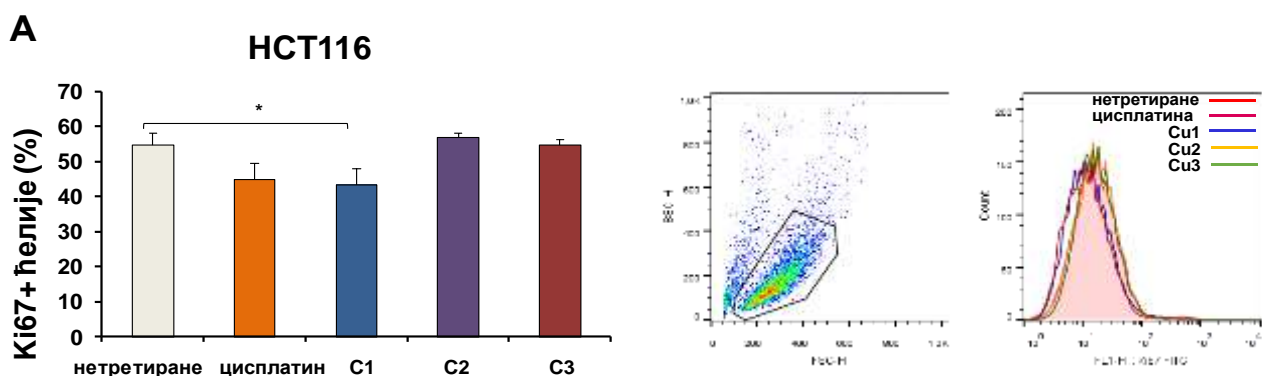
Ki67 је протеин који се везује за ДНК, изражен је у пролиферативним, али не и у мирујућим ћелијама и сматра се да учествује у процесу пролиферације. Антипролиферативни ефекти испитиваних молекула могу се проценити проценом нивоа експресије Ki67 у третираним ћелијама (121). Како би испитали потенцијалну антипролиферативну активност комплекса бакра анализирали смо проточном цитометријом проценат туморских ћелија које након третирања комплексима испољавају Ki67, као и ниво експресије овог молекула на нивоу ћелије. Процент LLC1 ћелија које након третирања свим комплексима бакра и цисплатином експримирају Ki67 је мањи у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 16А). Као што је приказано на Фигури 16А проценат Ki67 позитивних LLC1 ћелија третираних комплексом С2 (у дози од 62,5 μ М) значајно је мањи у поређењу са процентом Ki67 позитивних ћелија третираних цисплатином (Фигура 16А). Такође, значајно мања експресија Ki67 је уочена у ћелијама третираним цисплатином и комплексима С1 и С2 у поређењу са нетретираним LLC1 ћелијама (Фигура 16Б).

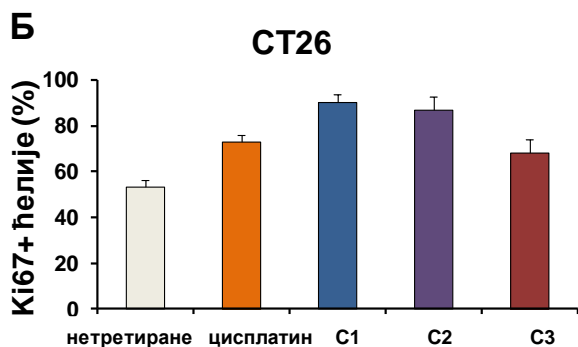




Фигура 16. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине смањују експресију Ki67 у ћелијама мишијег карцинома плућа. Процент Ki67 позитивних LLC1 (A) ћелија изложених бакар(II) комплексима или цисплатини (62.5 μ M) у току 24 h одређен проточном цитометријом представљен је као средња вредност +SD из три независна експеримента. Подаци су анализирани Студентовим t тестом, * $p < 0.05$ указује на разлику између третираних и нетретираних ћелија. Репрезентативни хистограм експресије (средњи интензитет флуоресценције) Ki67 у третираним и нетретираним ћелијама и стратегија гејтовања (Б).

Детектована је слабија антипролиферативна активност испитиваних комплекса бакра анализом овог ефекта на ћелијама хуманог (HCT116) и мишијег (CT26) карцинома колона (Фигура 17). Међу тестираним комплексима бакра са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине, само је C1 је испољио антипролиферативни ефекат на ћелијама хуманог колоректалног карцинома, HCT116. Процент Ki67 позитивних HCT116 ћелија је статистички значајно мањи ($p < 0.05$) након третмана комплексом C1 у поређењу са нетретираним ћелијама (Фигура 17A). Процент Ki67 позитивних HCT116 ћелија је мањи након третмана цисплатином у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама, али та разлика није статистички значајна (Фигура 17A). Мања експресија Ki67 ћелија је детектована у HCT116 ћелијама третираним комплексом C1, као и цисплатином, него у нетретираним ћелијама (Фигура 17A, десни панел). Комплекси бакра са дериватима тиосалицилне киселине не делују антипролиферативно на ћелије мишијег карцинома колона, односно не смањују проценат Ki67 позитивних CT26 ћелија (Фигура 17Б).



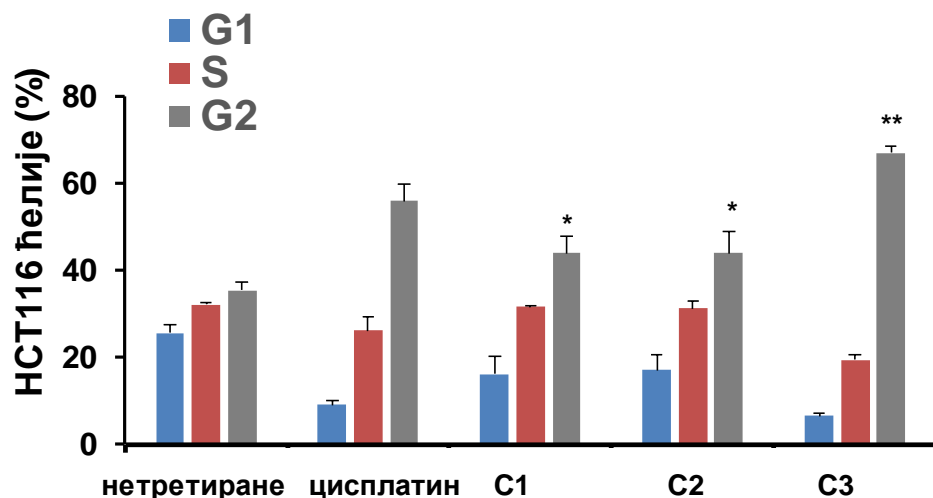
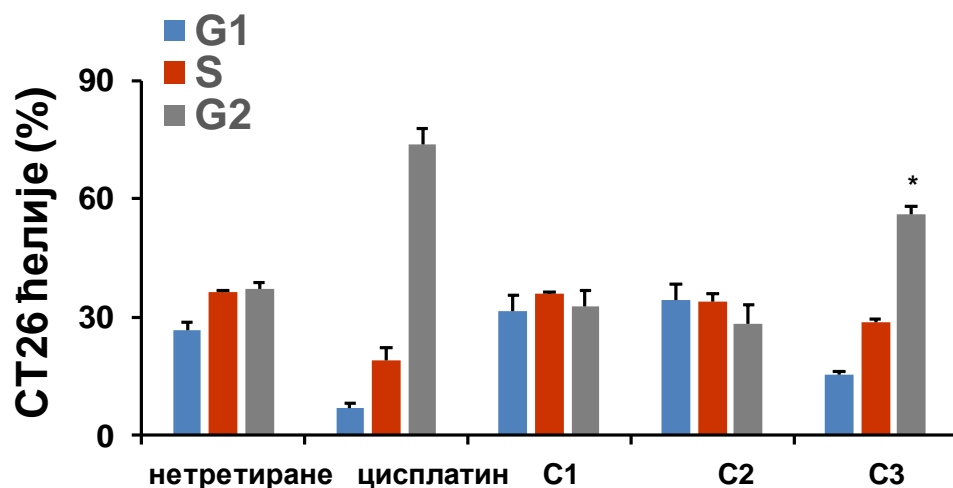


Фигура 17. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине остварују слаб антипролиферативни ефекат на ћелијама карцинома колона. Процент Ки67 позитивних НСТ116 (А) и СТ26 (Б) ћелија изложених комплексима бакра(II) или цисплатини (доза комплекса и цисплатине 62.5 μM) у току 24 сата одређен проточном цитометријом представљен је као средња вредност \pm SD из три независна експеримента. Подаци су анализирани Студентовим t тестом: * $p < 0.05$ указује на разлику између третираних и нетретираних ћелија. Репрезентативни хистограм експресије (средњи интензитет флуоресценције) Ки67 у НСТ116 ћелијама (А, десни панел).

4.11. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине заустављају туморске ћелије у G2/M фази ћелијског циклуса

Даље смо истражили да ли нови комплекси бакра(II) са са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине утичу на ћелијски циклус, па је проточном цитометријом анализиран проценат ћелија карцинома колона у различитим фазама ћелијског циклуса, нетретираних (гајених само у медијуму) и након дванаесточасовног третирања комплексима бакра или цисплатином у дози 62,5 μM . Третман и комплексима бакра и цисплатином значајно је повећао проценат НСТ116 ћелија које се налазе у G2/M у фази ћелијског циклуса (Фигура 18А). Даље, третман комплексима бакра и цисплатином смањило је проценат НСТ116 ћелија у S и G₀/G₁ фази ћелијског циклуса (Фигура 18А). С3 је имао највећи утицај на дистрибуцију НСТ116 ћелија по различитим фазама ћелијског циклуса ћелија, са највећим процентом ћелија у G2/M фази и великим смањењем процента ових ћелија које се налазе у S фази (Фигура 18А). Добијени подаци показују да бакар (II) комплекси са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине инхибирају ћелијску пролиферацију заустављањем напредовања ћелијског циклуса у G2/M фази и вероватно накнадном индукцијом апоптозе у НСТ116 ћелијама. Најјачи ефекат С3 на поремећај ћелијског циклуса је у складу са најизраженијим апоптотским ефектом овог комплекса на НСТ116 ћелије (Фигура 14).

Анализа ћелијског циклуса у СТ26 ћелијама третираних комплексима је показала да С3 изазива застој ових ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса (Фигура 18Б). Слично, цисплатина је (под истим условима третирања, 12 сати у дози 62.5 μM , као и комплекси бакра) изазвала акумулацију СТ26 ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса (Фигура 18Б). С1 и С2 нису изазвали поремећаје ћелијског циклуса СТ26 ћелија.

A**Б**

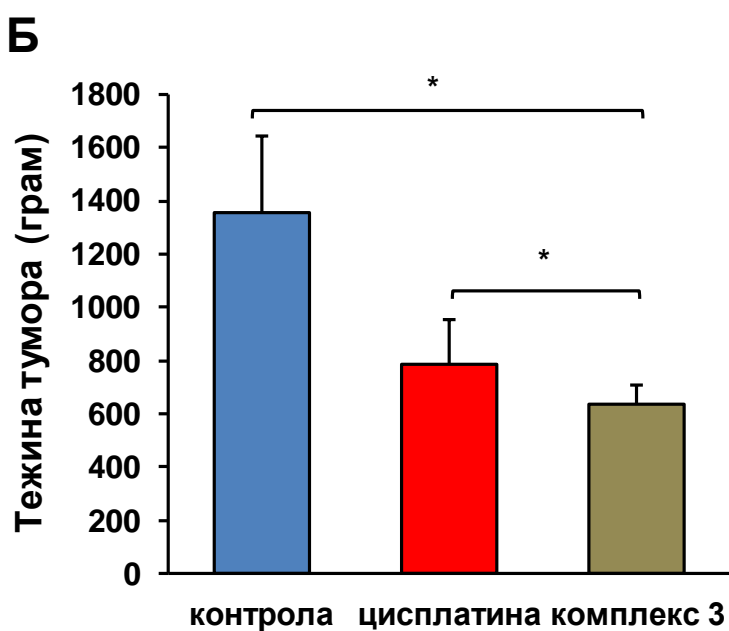
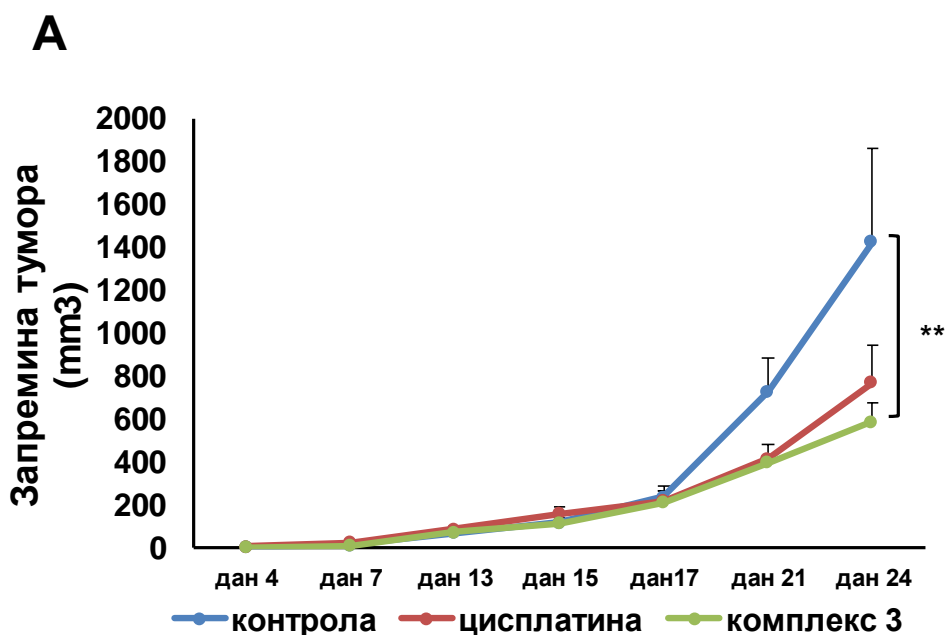
Фигура 18. Комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине индукују заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази. Расподела HCT116 и CT26 ћелија по различитим фазама ћелијског циклуса одређена је детекцијом ових ћелија обојених *Ruby* бојом проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност процента ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса (G1, S и G2/M) \pm SD у наведеним групама за 3 понављања, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ указују на разлику између третираних и нетретираних ћелија.

4.12. Антитуморски ефекат комплекса бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине у хетеротопском моделу карцинома колона миша

4.12.1. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине редукује раст примарног хетеротопског карцинома колона миша

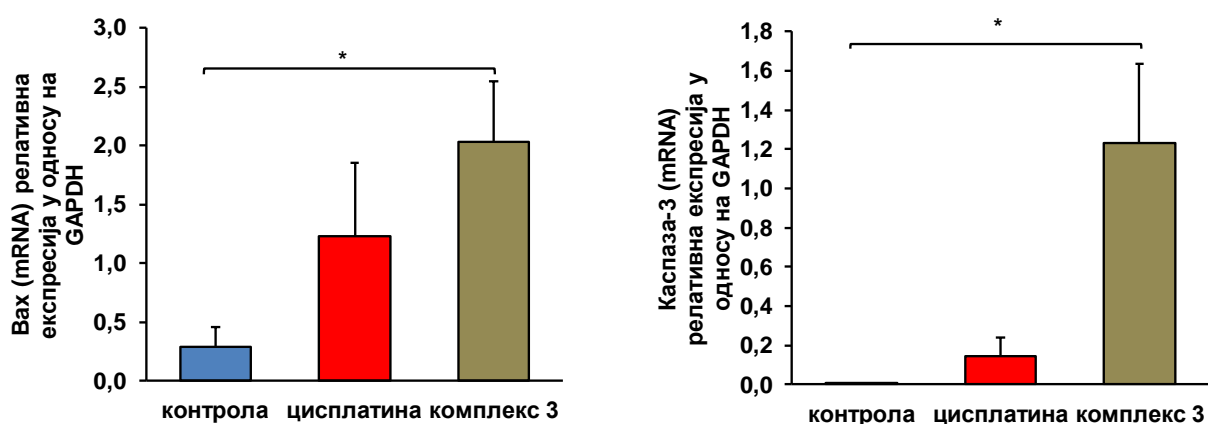
Позитивни ефекти аспирина (ацетилсалицилне киселине) у превенцији колоректалног карцинома су добро познати. Неколико различитих механизма је одговорно за описане позитивне ефекте ацетилсалицилне киселине у превенцији колоректалног карцинома укључујући инхибицију циклооксигеназе, индукцију апоптозе, инхибицију активности NF-κB, појачану регулацију тумор супресорских гена и инхибицију mTOR сигнализације (122). Наведене активности су вероватно посредоване салицилатом, главним метаболитом аспирина. Салицилат такође инхибира ензим лизин ацетилтрансферазу и процес епително-мезенхимске транзиције инхибицијом експресије муцина MUC1 и инхибицијом продукције проинфламацијских цитокина и на тај начин може да инхибира прогресију колоректалног карцинома будући да је прекомерно изражен MUC1 у ћелијама рака дебелог црева повезан са лошијом прогнозом (123). С обзиром да инфламацијско окружење промовише ћелијску пролиферацију, ангиогенезу и резистенцију на апоптозу и да салицилати имају антиинфламацијска дејства *in vivo* (124), даље су анализирани антитуморски ефекти комплекса бакра са тиосалицилним дериватом *in vivo* у хетеротопском моделу примарног карцинома колона миша. Највеће смањење вијабилности туморских ћелија карцинома колона миша остварио је С3 (Фигура 12В, Табела 10) које је праћено највећом селективношћу, на шта указује индекс селективности (Табела 11), па је за даље *in vivo* испитивање одабран овај комплекс. Као експериментални модел коришћен је модел примарног хетеротопског карцинома колона миша који је изазван субкутаном апликацијом 1×10^6 СТ26 ћелија у дорзолумбални предео BALB/с миша.

Кратки третман комплексом С3 у дози од 5 mg/kg телесне тежине, примењен у два циклуса са пет доза по циклусу, почевши од тринаестог дана након имплантације туморских ћелија, повезан је са значајним смањењем раста примарног хетеротопског карцинома колона миша (Фигура 19А). Четири дана након примања последње дозе испитиваног комплекса је запремина тумора у групи мишева третираних комплексом С3 значајно смањена у поређењу са групом нетретираних мишева (Фигура 19А). Третман цисплатином који је спроведен на исти начин као и третман комплексом бакра је такође смањио раст примарног тумора, али разлике у запремини тумора нису достигле статистичку значајност. Тежина тумора значајно је смањена код мишева третираних комплексом С3 у поређењу са нетретираним животињама (Фигура 19Б). Третман цисплатином је смањио тежину тумора у поређењу са нетретираним животињама, али ова разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 19Б). Штавише, средња вредност тежине екстирпираниог примарног тумора у групи мишева која је примала С3 је статистички значајно мања у поређењу са средњом вредношћу тежине тумора у групи мишева третираних цисплатином (Фигура 19Б).



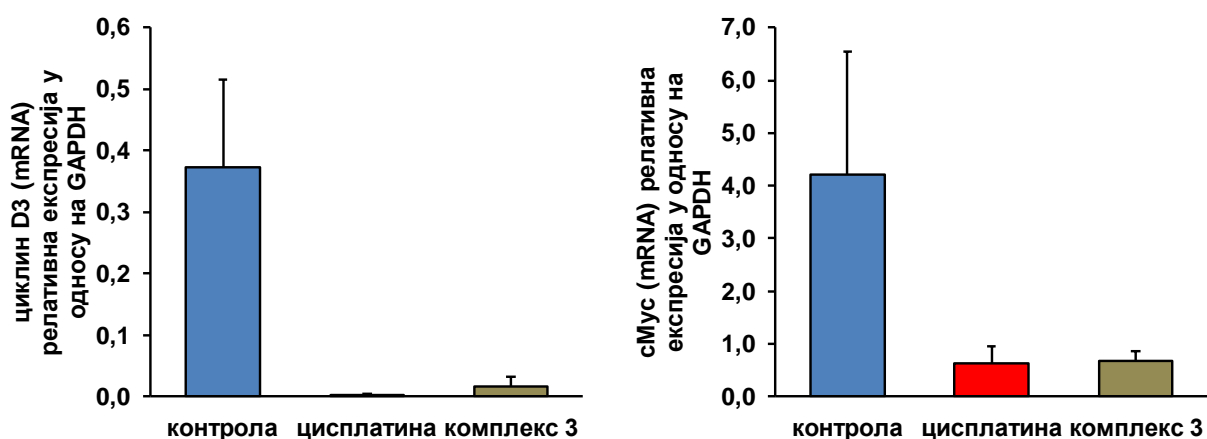
Фигура 19. С3 смањује раст примарног тумора. Мишевима су субкутано инјектиране СТ26 ћелије и од осмог дана су примали или комплекс бакра, или цисплатину или физиолошки раствор. А) Криве приказују запремину тумора по групама, у различитим данима од инокулације туморских ћелија, примена комплекса бакра и цисплатине је започета од 13. дана по инокулацији туморских ћелија; Б) График приказује тежину тумора по групама 24 дана од почетка примене испитиваних супстанци; * $p < 0.05$.

Експресија молекула укључених у процес апоптозе (ниво иРНК) анализирана је у ткиву примарног тумора *real time* RT PCR методом у све три групе мишева. Експресија проапоптотског молекула Вах и каспазе 3 је статистички значајно већа ($p < 0.05$) у групи мишева третираних комплексом С3 у поређењу са групом нетретираних мишева (Фигура 20). Експресија ових молекула је у групи мишева третираних цисплатином већа у поређењу са групом нетретираних мишева, али је мања него у групи мишева третираних комплексом С3 (Фигура 20). Налаз највеће експресије молекула укључених у апоптозу у ткиву примарног ткива карцинома колона мишева третираних комплексом С3 (Фигура 20) је у складу са налазом најмање запремине и тежине тумора у овој групи (Фигура 19).



Фигура 20. С3 повећава експресију проапоптотског молекула Вах и каспазе-3 у ткиву примарног тумора. Релативна експресија Вах и каспазе-3 у ткиву примарног тумора, нормализована у односу на експресију GAPDH анализирана је *real-time* qRT-PCR методом и приказана је као средња вредност \pm SD (5 узорака по групи). Статистичка значајност је одређена *Mann-Whitney* тестом, * $p < 0.05$.

Протоонкоген сМус учествује у прогресији ћелијског циклуса индукцијом експресије циклина D (125) што подстиче ћелијску деобу и раст тумора, па је *real time* RT PCR методом у ткиву примарног тумора анализирана експресија молекула сМус и циклина D3 (ниво иРНК). Експресија сМус и циклина D је смањена у групи мишева третираних комплексом С3 у поређењу са контролном групом мишева, али разлика није достигла статистичку значајност (Фигура 21). Ови резултати указују да С3 смањује раст тумора *in vivo*, вероватно и индукцијом апоптозе, али и инхибицијом деобе туморских ћелија.



Фигура 21. С3 смањује експресију циклина D3 и cMyc у ткиву примарног тумора. Релативна експресија циклина D3 и cMyc у ткиву примарног тумора, нормализована у односу на експресију GAPDH анализирана је *real-time* qRT-PCR методом и приказана је као средња вредност \pm SD (5 узорака по групи). Статистичка значајност је одређена *Mann-Whitney* тестом.

4.12.2. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине редукује метастазе у јетри и плућима мишева са примарним хетеротопским карциномом колона

Ткива јетре и плућа су анализирана 24 дана након инокулације туморских ћелија у групама нетретираних мишева и мишева који су интраперитонеално примили комплекс бакра или цисплатину. Урађена је хистолошка анализа по пет серијских пресека ткива јетре и плућа обојених хематоксилином и еозином.

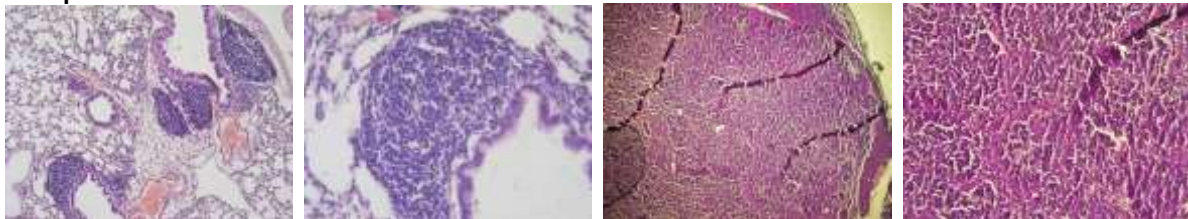
Табела 12. Инциденца метастазирања у јетри и плућима. Процент мишева са детектованим метастазама у плућима и јетри одређен је 24 дана после инокулације туморских ћелија у контролној групи и групама мишева које су примили 2 пута по пет доза цисплатине или комплекса бакра.

	Контрола	Цисплатина	С3
Процент мишева са метастазама у јетри	88,89	50	25
Процент мишева са метастазама у плућима	88,89	50	25

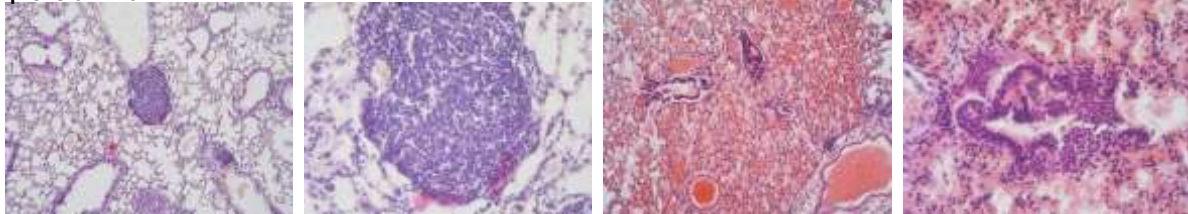
Хистолошком анализом плућа третираних и нетретираних мишева утврђено је да С3 смањује инциденцу појаве метастаза у плућима (Табела 12). И С3 и цисплатина су смањили проценат мишева који су развили метастазе у плућима након субкутане инокулације ћелија карцинома колона. Процент мишева који су развили метастазе у плућима у групи нетретираних мишева је 88,89, у групи мишева која је примала цисплатину тај проценат је 50, док је у групи која је примала С3 тај проценат 25. Резултати показују да је инциденца метастазирања у групи мишева који су примали С3 дупло мања у поређењу са групом мишева која је примала цисплатину.

Даља анализа ткивних исечака плућа је показала да је број метастаза по плућима већи у групи нетретираних мишева у поређењу са групама мишева третираних цисплатином и комплексом С3, али је број метастаза у плућима мишева третираних комплексом мањи у поређењу са групом мишева третираних цисплатином (Слика 2). Такође величина појединачних метастаза је највећа у групи нетретираних мишева, мања у групи мишева третираних цисплатином и најмања у групи мишева третираних комплексом С3. У групи нетретираних мишева су уочене метастазе које захватају читаве режњеве плућа (Слика 2, први ред, слике десно). Са друге стране, у плућима третираних мишева су уочена поља крварења која окружују метастазе (Слика 2, други и трећи ред, слике десно). Крварења су израженија у плућима мишева третираних цисплатином него у групи мишева третираних комплексом С3.

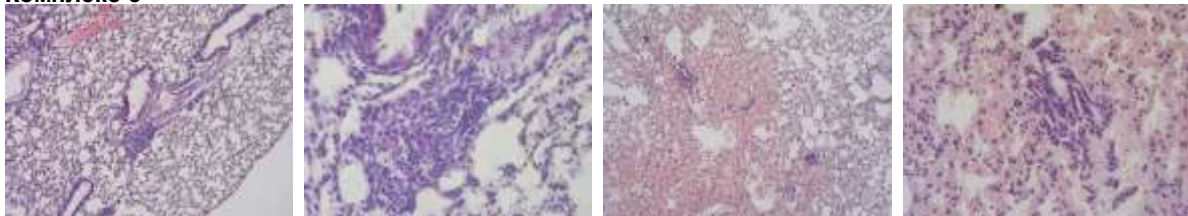
Контрола



Цисплатина



Комплекс 3

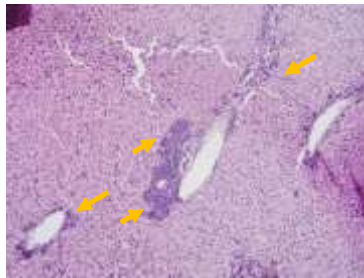
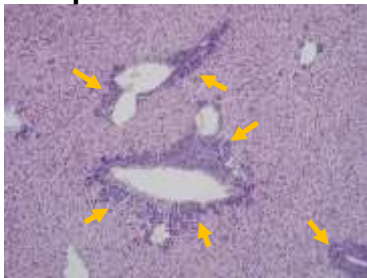


Слика 2. Репрезентативни исечци ткива плућа обојених хематоксилином и еозином 24 дана након трансплантације СТ26 ћелија.

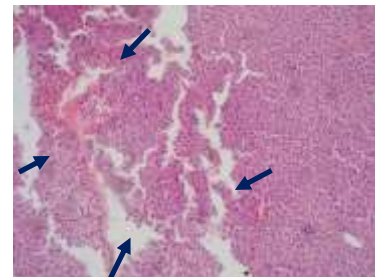
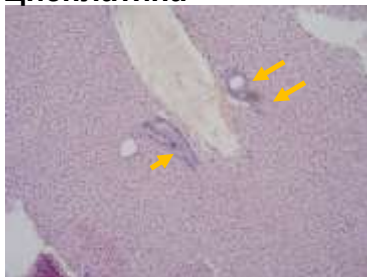
Налази добијени анализом исечака јетре су слични налазима анализе ткива плућа. С3 је смањивао инциденцу метастазирања у јетри (Табела 12). Мишеви којима су СТ26 ћелије апликоване субкутано, а који нису третираны комплексом бакра или цисплатином у 88,89% су развили метастазе у јетри, наспрот 50% мишева са метастазама у јетри који

су примали цисплатину и 25% мишева са метастазама у јетри у групи која је примала С3 (Табела 12). Слично као и у плућима, површине метастаза у јетри нетретираних мишева су веће у поређењу са величином метастаза у јетрама мишева третираних цисплатином (Слика 3). У јетрама мишева третираних комплексом бакра су уочене минималне метастазе, инципијентне, које окружују крвне судове или жучне путеве (Слика 3). Број метастаза по јетри је највећи у групи нетретираних мишева, мањи у групи мишева третираних цисплатином и најмањи у групи мишева третираних комплексом С3. Поља крварења су уочена у јетрама у све три групе мишева. Најмању површину заузимају поља крварења у јетри мишева третираних комплексом С3 (Слика 3, слике десно).

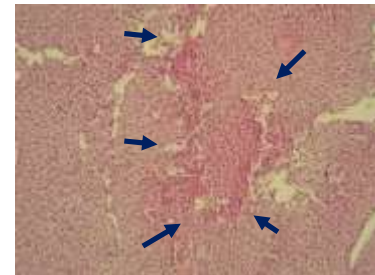
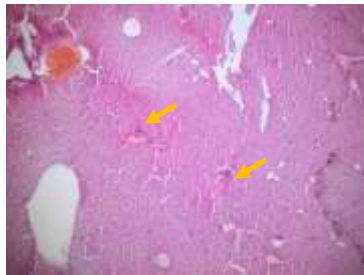
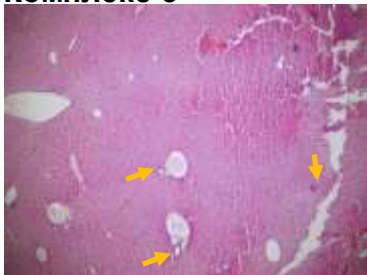
Контрола



Цисплатина



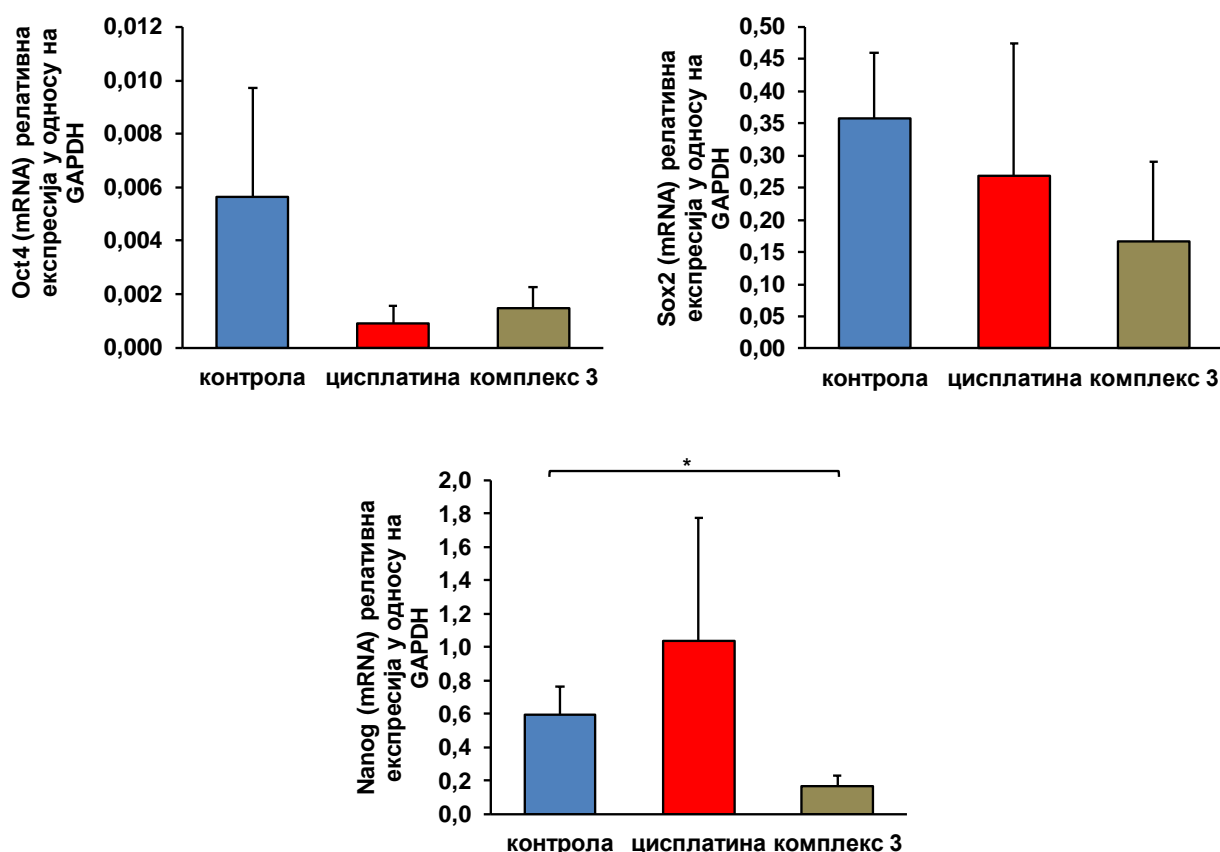
Комплекс 3



Слика 3. Репрезентативни исечци јетре обојени хематоксилином и еозином 24 дана након трансплантације СТ26 ћелија (жуте стрелице означавају метастазе, а тегет поља крварења).

4.12.3. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине у ткиву примарног тумора смањује експресију маркера канцерских матичних ћелија Nanog

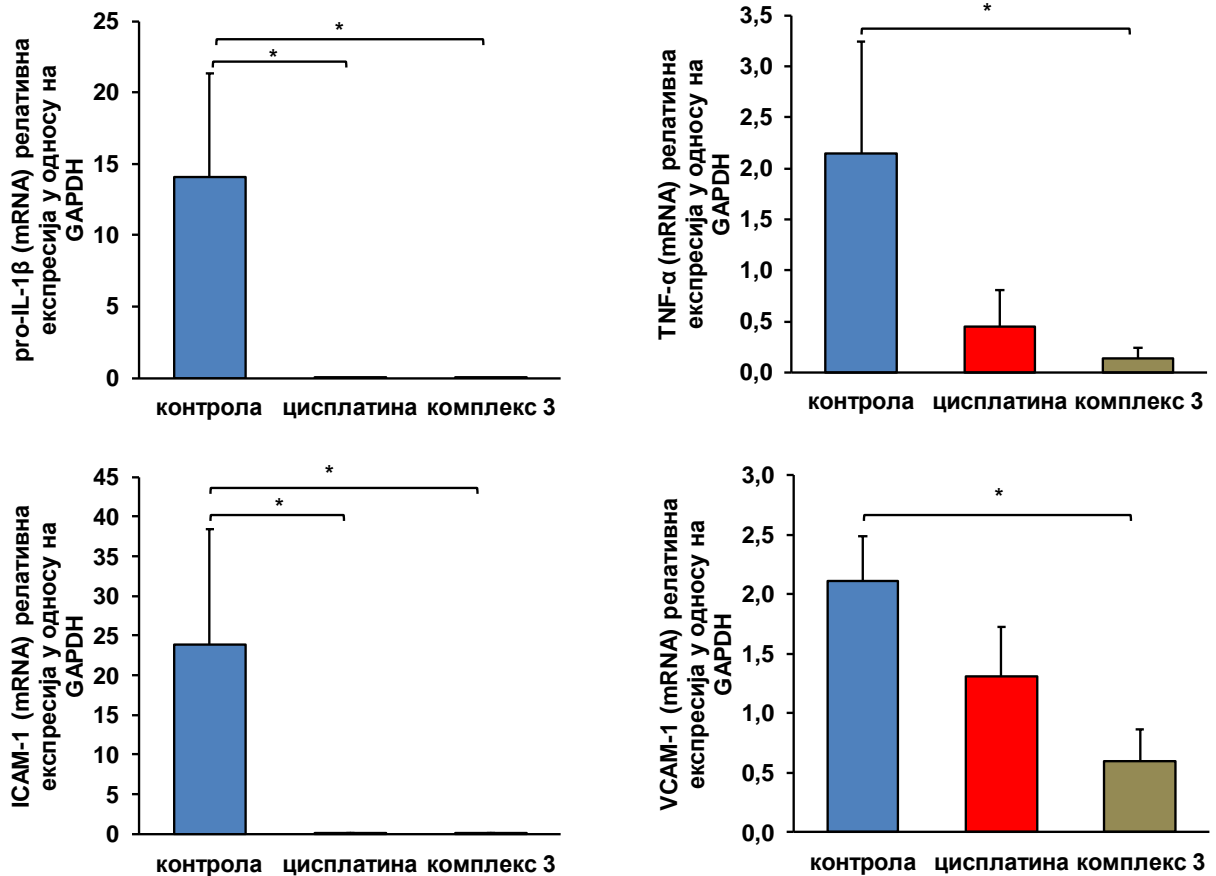
Канцерске матичне ћелије играју кључну улогу у релапсима и метастазирању колоректалног карцинома (126). Колоректалне канцерске матичне ћелије, поред специфичних маркера као што су CD44, CD133, CD166, Lgr5, ALDH1 и EpCAM, експримирају универзалне маркере матичности Nanog, Sox2 и Oct-4 (127) (128). Испитали смо утицај С3 на експресију универзалних маркера матичности канцерских матичних ћелија у ткиву примарног тумора *real time* RT PCR методом. Добијени резултати (Фигура 22) указују да С3 смањује експресију сва три испитивана маркера канцерских матичних ћелија у ткиву примарног СТ26 тумора миша, за разлику од цисплатине која утиче на повећање експресије Nanog. Иако је експресија сва три маркера матичности смањена у групи мишева који су примали С3 у поређењу са контролном групом, статистички је значајно смањена само експресија Nanog (Фигура 22).



Фигура 22. С3 смањује експресију маркера матичности у ткиву примарног тумора. Релативна експресија Oct4, Sox2 и Nanog у ткиву примарног тумора, нормализована у односу на експресију GAPDH анализирана је *real-time* qRT-PCR методом и приказана је као средња вредност \pm SD (5 узорака по групи). Статистичка значајност је одређена *Mann-Whitney* тестом.

4.12.3. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине смањује експресију маркера инфламације у ткиву примарног тумора

Инфламација игра битну улогу како у инцијацији, тако и у прогресији колоректалног кацринома. Описана су три типа инфламације која утиче на развој колоректалног карцинома, хронична инфламација која претходи канцерогенези, инфламација коју покрећу саме туморске ћелије и инфламација коју изазива терапија (129). Сва три типа запаљења за последицу имају стварање микросредине која промовише раст тумора. Инфламација коју покрећу туморске ћелије је протуморска, односно подстиче раст тумора и формирање удаљених метастаза (38). Пошто је испитивани комплекс бакра конјугован са дериватом тиосалицилне киселине, испитан је и потенцијални ефекат комплекса на смањење инфламације у ткиву тумора. *Real time* RT PCR методом је испитан утицај С3 на експресију инфламацијских молекула TNF- α , про-IL- β , ICAM-1, VCAM-1 у ткиву примарног тумора. Као што се види на Фигури 23, С3 статистички значајно смањује експресију (ниво иРНК) инфламацијских молекула TNF- α , про-IL- β , ICAM-1, VCAM-1 у ткиву тумора, за разлику од цисплатине која значајно смањује експресију про-IL- β и ICAM-1.



Фигура 23. С3 значајно смањује експресију инфламацијских молекула у ткиву примарног тумора. Релативна експресија про-IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 и VCAM-1 у ткиву примарног тумора, нормализована у односу на експресију GAPDH анализирана *real-time* qRT-PCR методом приказана је као средња вредност \pm SD (5 узорака по групи). Статистичка значајност је одређена *Mann-Whitney* тестом.

5. ДИСКУСИЈА

Инциденца колоректалног карцинома и морталитет узрокован овим тумором имају све већу стопу на глобалном нивоу. Стандардно лечење колоректалног карцинома укључује хируршки третман, хемотерапију и радиотерапију који се често комбинују. Хемотерапија је, због неспецифичне цитотоксичности и значајног оштећења нормалних ћелија које се деле, поред развоја резистенције праћена и бројним нежељеним ефектима. Због тога постоји стална потреба за развојем нових ефикаснијих и алтернативних терапеутика за лечење оболелих од колоректалног карцинома. Комплекси платине се стандардно користе системски у терапији различитих тумора од шездесетих година двадесетог века (130), а оксалиплатина се у комбинацији са 5-флуороурацилом користи као стандардни хемотерапеутик за лечење узнапредовалог колоректалног карцинома (131). Бројни озбиљни нежељени ефекти терапије лековима који садрже платину условили су дизајнирање нових терапеутика који садрже друге прелазне метале. Бакар је метал који се у већој концентрацији налази у туморским него у нормалним, здравим, ћелијама због активних система транспорта, па постоји могућност да комплекси бакра са одговарајућим лигандом имају селективнију цитотоксичност, што је утицало на развој различитих серија комплекса бакра у циљу проналажења потенцијалног селективнијег хемотерапеутика. Неколико комплекса бакра је тренутно у фази клиничких студија у којима се испитује њихов антитуморски ефекат, али и могућност примене у дијагностици хипоксичних подручја различитих тумора (132).

У овој студији је по први пут показано да бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине зауставља туморске ћелије карцинома у G2/M фази остварује цитотоксички ефекат у ћелијама мишјег карцинома колона и значајно смањује експресију инфламацијских цитокина у ткиву примарног CT26 карцинома колона миша што резултује значајним смањењем раста и метастазирања примарног тумора.

Резултати ове студије показују да бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине значајно смањују вијабилност мишијих ћелија карцинома колона CT26, умерено слабо смањују вијабилност хуманих ћелија колоректалног карцинома HCT116 и SW480 (Фигура 12), а остварују слаб цитотоксички ефекат на ћелије хуманог и мишјег карцинома плућа (Фигура 11, Табела 10). Међу испитиваним комплексима најјачи цитотоксички ефекат остварио је бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине на свим испитиваним туморским ћелијским линијама (Табела 10). Поред тога овај комплекс је показао и најбољи индекс селективности (Табела 11), који је на CT26 ћелијама био већи од индекса селективности цисплатине.

Раније су синтетисани и окарактерисани комплекси бакра(II) са алкил дериватима тиосалицилне киселине (133) и анализирана је њихова антитуморска активност (93). Показано је да ови комплекси бакра остварују слаб цитотоксички ефекат на ћелијама мишјег карцинома колона, CT26 и CT26.CL25, и ћелијама хуманог колоректалног карцинома HCT116 (93). Комплекси паладијума са истим лигандима испољавају бољи антитуморски ефекат на ћелијама хуманог колоректалног карцинома, HCT116 и CaCo-2, и хуманог аденокарцинома плућа, A549, у поређењу са истим комплексима бакра (133) (134). Комплекси Zn(II) са истим лигандима показују релативно умерену цитотоксичност на ћелијама мишјег, 4T1, и хуманог, MDA-MB-468, карцинома дојке (135). Комплекси платине(IV) са истим лигандима показали су значајну цитотоксичност на ћелијама мишје леукемије, BCL1, а умерен до слаб ефекат на ћелијама хумане В-пролимфоцитне леукемије JVM-13 (136). Бинуклеарни комплекс 3 испитиван у овој студији показао је бољи цитотоксички ефекат на ћелијама мишјег

карцинома колона у поређењу са сличним моонуклеарним комплексима (93). Такође у овој студији је показан бољи цитотоксички ефекат комплекса С3 на мишијим ћелијским линијама, нарочито на линији мишијег карцинома колона СТ26 него на хуманим ћелијским линијама колоректалног карцинома SW480 и НСТ116, и карцинома плућа, А549, за разлику од студије у којој је показано да комплекс Cu(II) са госсерелин ацетатом (аналогом хормона који стимулише ослобађање гонадотропина) испољава бољи цитотоксички ефекат на ћелијама хуманог аденокарцинома плућа А549 него на ћелијској линији мишијег карцинома колона СТ26 (137). Различит ефекат бинуклеарних комплекса бакра са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на различите туморске ћелије (бољи ефекат на ћелије колоректалног карцинома у поређењу са утицајем на ћелије карцинома плућа) је у складу са резултатима скорије студије у којој је показано да комплекси Cu(II) са дериватима Шифових база испољавају различит ефекат на ћелијама колоректаног карцинома DLD-1 и ћелијама хуманог карцинома дојке MDA-MB-231 (138). Цитотоксичност *in vitro* комплекса бакра испитиваних у овој студији је слабија у поређењу са на исти начин испитиваном цитотоксичношћу комплекса Cu(II) са пиролизинима (139). Слично резултатима ове студије, показан је умерен цитотоксички ефекат комплекса Cu(II) са тридентатним Шифовим базама са различитим халогенима на ћелијама хуманог колоректалног карцинома НСТ116, док су исти комплекси испољили веома изражен ефекат на ћелијама хуманог карцинома оваријума (140). Описани су веома добри цитотоксички ефекти комплекса Cu(II) са дериватима салицилне киселине на ћелијама хуманог колоректалног карцинома НТ29 (141).

Једињења која испољавају антитуморску активност, ту активност осварују веома често интракцијом са различитим молекулима као што су ДНК, протеини, али и делови ћелијске мембране (142). Бинуклеарни комплекси бакра испитивани у овој студији остварују релативно слабе интеракције са хуманим серумским албумином и молекулом ДНК, а најјаче интеракције са ова два молекула остварује комплекс С2 (Табеле 7, 8 и 9). Како најбољу цитотоксичност *in vitro* остварује комплекс С3, највероватније је да интеракција са ДНК слабо доприноси антитуморској активности бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине.

Апоптоза је процес програмиране ћелијске смрти оштећених, некорисних или остарелих ћелија који је веома често мета деловања приликом дизајнирања и испитивања нових потенцијалних антитуморских лекова (143). Антитуморски агенси покрећу спољашњи или унутрашњи пут апоптозе, а крајњи резултат је активација каспаза и ћелијска смрт (144). Кључни догађај у процесу апоптозе која је покренута унутрашњим путем је ослобађање цитохрома с из митохондрија које регулишу протеини из bcl-2 фамилије (145). Ослобађање цитохрома с контролише релативни однос антиапоптотских bcl-2, bcl-XL и bcl-w и проаптоптоских протеина бах и бак (146). Спољашњи пут апоптозе активира везивање лиганата за рецепторе смрти из фамилије TNF (енгл. *Tumour Necrosis Factor*) рецептора (147), формира се сигнални комплекс који активира каспазу 8 која последично активира ефекторску каспазу 3 што резултује апоптотском смрћу.

Комплекси бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине остварују умерен апоптотски ефекат на ћелије мишијег и хуманог колоректалног карцинома (93). У складу са тим налазом је и релативно слаб апоптотски ефекат бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине на СТ26 ћелијама (Фигура 15). Од испитиваних комплекса С1 је испољио најјачи апоптотски ефекат на СТ26 ћелијама са просечно 10% СТ26 ћелија у раној и око 6% у касној апоптотози, 24 сата након третмана комплексом концентрације 50 μ M. Најслабији ефекат испољио је С3 са

просечно 5% CT26 ћелија у касној и 3% у раној апоптози. Исти комплекси су показали различите апоптотске ефекте на ћелијама хуманог колоректалног карцинома HCT116. Најизражени апоптотски ефекат на HCT116 ћелијама испољио је C3 са просечно 10% HCT116 ћелија у раној и 5% у касној апоптози (Фигура 14) након третирања спроведеног на исти начин као што су третиране и CT26 ћелије. Слабије и веома сличне ефекте испољили су комплекси C1 и C2 (Фигура 14). Међутим, ови комплекси су испољили веома изражен, израженији него цисплатина, апоптотски ефекат на ћелијама мишјег *Lewis* карцинома плућа LLC1. Више од 50% LLC1 ћелија третираних испитиваним комплексима бакра (C1-C3) је у касној фази апоптозе и 5-10% у раној фази апоптозе (Фигура 13). Највећи проценат апоптотских LLC1 ћелија детектован је након третмана комплексом C3, али нема значајне разлике у процентима апоптотских ћелија третираних испитиваним комплексима бакра. Ови налази се разликују од резултата испитивања цитотоксичности МТТ тестом којим је показан бољи цитотоксички ефекат комплекса бакра на CT26 у поређењу са ефектом на LLC1 линији, а који је доста израженији у поређењу са цитотоксичним ефектом на хуманим линијама (HCT116 и A549). Ови налази указују да је цитотоксичност испитиваних комплекса бакра на CT26 ћелијама *in vitro* мало вероватно последица апоптотске смрти. Добра апоптотска активност различитих комплекса Cu(II) на ћелијским линијама хуманог колоректалног карцинома је раније описана (148-151). Слично резултатима ове студије, Cu(I) тиоцијанатни комплекси са фосфинским дериватима спарфлораксина испољавају благ до умерен апоптотски ефекат на CT26 ћелијској линији (152).

Хромозомска нестабилност која је у основи 60-80% колоректалних карцинома веома често погађа гене чији продукти учествују у контроли апоптозе. Мутација APC гена која је један од најранијих доагађаја у процесу канцерогенезе колоректалног карцинома праћена је променом баланаса про- и анти- апоптотских протеина у ћелији чинећи је резистентном на апоптотске стимулусе као што су хемотерапеутици (153). p53 ген је мутуран у око 70% колоректалних карцинома (154). Протеин p53 учествује у регулацији ћелијског циклуса, механизмима поправке ДНК и апоптозе, а шта ће од наведених процеса бити резултат активације p53 зависи од типа ћелије и микроокружења (155). Мутација p53 у ћелијама хуманог колоректалног карцинома HCT116, је таква да чини ове ћелије осетљивијим на радиотеапију и адријамицин, а мање осетљивим на 5-флуороурацил (156). Могуће је да су мутације у CT26 ћелијама такве, да ове ћелије чине релативно неосетљивим на апоптозу изазвану бинуклеарним комплексима бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине, што не искључује друге механизме антитуморске активности.

Третман комплексом C2 је значајно смањио проценат LLC1 ћелија које експримирају Ki-67 (Фигура 16), док је проценат HCT116 ћелија које експримирају Ki-67 значајно смањен након третмана комплексом C1 (Фигура 17). Испитивани комплекси нису смањили проценат Ki-67 позитивних CT26 ћелија (Фигура 17). Испитивани бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине испољили слаб утицај на експресију Ki-67 молекула који се сматра маркером пролиферације ћелија (157), што указује на њихов слаб антипролиферативни потенцијал.

Када степен оштећења ДНК премаши потенцијал механизма поправке ДНК, ћелија би могла да обезбеди додатно време задржавањем у G1/S или G2/M контролној тачки ћелијског циклуса ради поправке оштећења ДНК (158). Ако поправка не буде успешна, у ћелији се може активирати програмирана ћелијска смрт или зауставити пролазно (мировање) или трајно (старење) ћелијска деоба, или ћелија буде приморана да уђе у митозу, што резултује митотском катастрофом и за последицу има инхибицију

клоногене активности туморских ћелија (159). Ћелије које се налазе у процесу митотске катастрофе су у G2/M фази ћелијског циклуса (160). Митотска катастрофа је поремећена митоза која за резултат има ћелијску смрт која се по механизму разликује од апоптотске или некротске смрти (161). С3 комплекс који је испољио најјачу цитотоксичку активност на свим испитиваним туморским ћелијским линијама (Табела 10) изазвао је и акумулацију СТ26 и НСТ116 ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса (Фигура 18). Дакле, иако С3 не индукује значајну апоптозу СТ26 ћелија, највећи потенцијал за смањење вијабилности СТ26 процењен МТТ тестом могао би да се објасни заустављањем СТ26 ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса под дејством С3 и смањењем вијабилности СТ26 другим механизмима (као што је митотска катастрофа) (162). Сличан ефекат индукције митотске катастрофе и последичне смрти ћелија хуманог неситноћелијског карцинома плућа, Н-460, описан је за троструки комплекс Cu(II) са L-тирозином и дииминима (163).

Познато је да инфламација утиче на процес канцерогенезе, да може да претходи развоју тумора, али и да инфламација изазвана самим развојем тумора или применом хемотерапеутика може да допринесе даљој прогресији тумора. Бројне студије су показале да аспирин (ацетилсалицилна киселина) смањује стопу рецидива колоректалног аденома, узнапредовалог аденома, број понављајућих аденома и одлаже време до рецидива аденома (164-167) и да смањује ризик од развоја колоректалног карцинома (168, 169). Аспирин остварује директни ефекат на епителне ћелије колоне, као и туморске ћелије, али делује и на имунске ћелије присутне у туморском ткиву, модулише инфламацију и тако утиче на развој и прогресију колоректалног карцинома. Неутрофили и фибробласти присутни у туморском ткиву продукују проинфламацијске цитокине и хемокине, TNF- α , IL-1 β , IL-6 и CXCL1, који стимулишу активност циклооксигеназе-2 (COX-2 од енг. *Cyclooxygenase-2*) и тако продукцију простагландина E2 (PGE₂ од енг. *Prostaglandin E2*) у околним неутрофилима и фибробластима (170). PGE₂ онда делује повратно на исте ћелије, фибробласте и неутрофиле, формира позитивну повратну спрегу која појачава инфламацију (171) појачава продукцију IL-23 а смањује продукцију IL-12 што подстиче експанзију Th17 ћелија у туморском ткиву (172-174) које су иначе повезане са прогресијом колоректалног карцинома. Аспирин делује као инхибитор циклооксигеназе-2, смањује продукцију PGE₂ и тако смањује инфламацију и последично смањује ризик од развоја и прогресије колоректалног карцинома (175). Тиосалицилна киселина, као и аспирин, припада групи нестероидних антиинфламацијских лекова, па је могуће да комплекси метала са дериватима ове киселине као што је и бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине остварују појачан антитуморски ефекат *in vivo* у карциному колоне делујући директно на туморске ћелије, али и посредно инхибицијом инфламације. С3 је значајно смањено раст примарног хетеротопског СТ26 карцинома миша и у односу на нетретиране мишеве (Фигура 19). Још значајнији резултат је значајно мања тежина екстирпираниог примарног тумора у групи мишева третираних комплексом С3 у поређењу са групом мишева третираних цисплатином (Фигура 19). Терапија мишева комплексом С3 праћена је и мањом инциденцом метастаза (Табела 12) у плућима и јетри и мањом величином метастатских промена (Слике 2 и 3). Овај резултат је у складу са налазом најјаче цитотоксичке активности С3 на СТ26 ћелијама (Табела 10), са IC50 вредношћу која је мања од IC50 вредности добијене тестирањем ефекта цисплатине на истим ћелијама и у истим условима. У ткиву примарног тумора мишева третираних комплексом С3 детектована је и значајно већа експресија иРНК молекула који су кључни за процес апоптозе, Вах и каспаза-3 (Фигура 20), а значајно мања експресија проинфламацијских молекула TNF- α , про-IL- β , ICAM-1 и VCAM-1 (Фигура 23) у поређењу са ткивом нетретираних мишева.

Блокирање IL-1 β у мишјем моделу колоитиса и удруженог карцинома колона значајно смањује величину и инвазивност тумора (176, 177) што указује на значајну улогу овог цитокина у настанку и прогресији колоректалног карцинома. TNF- α подстиче миграцију туморских ћелија и инвазивност колоректалног карцинома (178) а учествује и у колоректалној канцерогенези удруженој са улцерозним колитисом (179). VCAM-1 је молекул који је експримиран у колоректалном карциному, удружено са присутним CD3+ лимфоцитима (180) и који учествује у инфилтрацији тумора имунским ћелијама. ICAM-1 је молекул чију експресују контролишу цитокини TNF- α и IL- β и који игра важну улогу у колоректалној патогенези, учествује у међусобној интеракцијама између туморских ћелија као и са екстраћелијским матриксом, у спровођењу сигнала и бројним имунским процесима (181). Ћелије колоректалног карцинома, за разлику од нормалних ћелија цревног епитела, експримирају ICAM-1 који интеракцијом са лигандима подстиче метастазирање тумора (182, 183). Експресија ICAM-1 одређује малигни потенцијал колоректалног карцинома, у корелацији је са лошијом прогнозом (184, 185), мада има и студија које указују да мембранска експресија овог молекула утиче на бољу прогнозу колоректалног карцинома (186) што се објашњава могућношћу ICAM-1 експримираног на мембрани туморских ћелија да подстакне убијање туморских ћелија цитотоксичким лимфоцитима уколико су они присутни у туморској микросредини. Солубилни ICAM-1 промовише ангиогенезу и раст колоректалног карцинома (187). Већа експресија ICAM-1 молекула у туморском ткиву може да резултује и појачаном апоптозом туморских ћелија (188).

Бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине остварује доста убедљив антитуморски ефекат *in vivo* у моделу карцинома колона миша, значајно смањујући раст примарног тумора и инциденцу и величину метастаза у плућима и јетри. Како је *in vitro* антитуморски ефекат овог комплекса умерен, могуће је да је смањен раст и метастазирање карцинома колона последица модулације туморске микросредине испитиваним комплексом. Имајући у виду значај инфламације за настанак али и прогресију колоректалног карцинома, могуће је да СЗ утицајем на експресију инфламацијских молекула TNF- α , про-IL- β , ICAM-1 и VCAM-1 у ткиву примарног тумора смањује раст и прогресију тумора, али и да подстиче апоптозу туморских ћелија *in vivo*.

6. ЗАКЉУЧЦИ

У оквиру ове докторске дисертације синтетисани су нови S-изоалкил деривати тиосалицилне киселине и одговарајући комплекси бакра(II). Добијени комплекси припадају категорији бинуклеарних комплекса што је одговарало и структури раније описаних комплекса бакра(II) са структурно сличним S-алкил дериватима тиосалицилне киселине. Вредности моларних проводљивости за бинуклеарне комплексе потврђују да су комплекси електронеутрални.

Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине, а нарочито комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, заустављају туморске ћелије G2/M фази ћелијског циклуса и значајно редукују вијабилност ћелија мишјег карцинома плућа LLC1 и мишјег карцинома колона СТ26. Комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине значајно смањује експресију инфламацијских молекула у ткиву примарног хетеротопског карцинома колона миша, што резултује значајним смањењем раста и метастазирања тумора.

Закључак проистиче из следећих експерименталних налаза:

1. Састав добијених једињења потврђен је на основу резултата елементарне микроанализе при чему је закључено да су израчунате вредности процентуалне заступљености сумпора, водоника и угљеника у сагласности са експериментално добијеним вредностима.
2. На основу инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије потврдили смо структуру синтетисаних S-изоалкил деривата тиосалицилне киселине.
3. На основу инфрацрвене спектроскопије претпостављена је структура комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине и потврђено је координовање добијених лиганата за бакар(II)-јон.
4. На основу резултата рендгенске структурне анализе потврђена је претпостављена структура комплекса бакра(II) са S-изопропил дериватом тиосалицилне киселине.
5. Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине редукују вијабилност ћелија мишјег карцинома колона и *Lewis* мишјег карцинома плућа *in vitro*.
6. Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине остварују слаб антипролиферативни ефекат на туморске ћелије *in vitro*.
7. Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине, а нарочито комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, остварују значајан проапоптотски ефекат на LLC1 ћелије.
8. Бинуклеарни комплекси бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине, а нарочито комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине, утичу на заустављање ћелијског циклуса туморских ћелија у G2/M фази.
9. Бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине значајно смањује раст примарног хетеротопског карцинома колона миша, као и инциденцу метастазирања, величину и број метастаза у плућима и јетри.
10. Бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изоамил дериватом тиосалицилне киселине значајно смањује експресију маркера инфламације про-IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 и VCAM-1 у ткиву примарног тумора.

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. WHO. Cancer. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LA. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010;116(3):544-73.
3. Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*. 2009;29(7):2727-37.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-67.
5. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012, 487, 330.
6. 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):31.
7. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020;158(2):291-302.
8. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(6):1130-4.
9. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
10. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
11. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2008;135:1079-99.
12. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992;359(6392):235-7.
13. Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res*. 2005;306:357-63.
14. Schepers A, Clevers H. Wnt signaling, stem cells, and cancer of the gastrointestinal tract. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a007989.

15. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1603-8.
16. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist*. 2008;13(12):1270-5.
17. Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*. 2001;171:1-10.
18. Wang D, Fu L, Sun H, Guo L, DuBois RN. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1884-95.e4.
19. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N; TP53-CRC Collaborative Study Group. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7518-28.
20. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-60.
21. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1990;50(23):7717-22.
22. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248-57.
23. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995;55(23):5548-50.
24. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repairdeficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 2002;62:2447-54.
25. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, Kuehl PM, Langenberg P, Meltzer SJ, Stine OC. Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res*. 2001;61(16):6046-9.
26. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Br. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.

27. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):153-8.
28. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681-6.
29. Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian ZR, Inamura K, Kim SA, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Willett WC, Rosner BA, Fuchs CS, Giovannucci E, Ogino S, Chan AT. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med*. 2013;369(12):1095-105.
30. He X, Hang D, Wu K, Naylor J, Drew DA, Giovannucci EL, Ogino S, Chan AT, Song M. Long-term Risk of Colorectal Cancer After Removal of Conventional Adenomas and Serrated Polyps. *Gastroenterology*. 2020;158(4):852-61.e4.
31. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004;53(8):1137-44.
32. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2654-66.
33. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
34. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grützmann R, Van den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Léonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, Vocka M, Spacek J, Petruzalka L, Konopasek B, Dundr P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Haicheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, van de Water C, van Lent-van Vliet S, Knijn N, Muşină AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhashi T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA, Galon J. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;391(10135):2128-39.
35. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(11):662-80.
36. Malka D, Lièvre A, André T, Taïeb J, Ducreux M, Bibeau F. Immune scores in colorectal cancer: Where are we? *Eur J Cancer*. 2020;140:105-18.
37. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(6):307-25.

38. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.
39. Newmark HL, Yang K, Kurihara N, Fan K, Augenlicht LH, Lipkin M. Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(1):88-92.
40. Canli Ö, Nicolas AM, Gupta J, Finkelmeier F, Goncharova O, Pesic M, Neumann T, Horst D, Löwer M, Sahin U, Greten FR. Myeloid Cell-Derived Reactive Oxygen Species Induce Epithelial Mutagenesis. *Cancer Cell*. 2017;32(6):869-83.e5.
41. Janney A, Powrie F, Mann EH. Host-microbiota maladaptation in colorectal cancer. *Nature*. 2020;585(7826):509-17.
42. Pesic M, Greten FR. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;43:55-61.
43. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Takeeto MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC, Greten FR. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013;152(1-2):25-38.
44. Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle AA, Dann SM, Mages J, Lang R, Robine S, Kagnoff MF, Schmid RM, Karin M, Arkan MC, Greten FR. Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(39):15058-63.
45. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2007;446(7135):557-61.
46. Shaked H, Hofseth LJ, Chumanevich A, Chumanevich AA, Wang J, Wang Y, Taniguchi K, Guma M, Shenouda S, Clevers H, Harris CC, Karin M. Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):14007-12.
47. Bollrath J, Greten FR. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep*. 2009;10(12):1314-9.
48. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-13. .
49. Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, Lozano G, Pikarsky E, Forshew T, Rosenfeld N, Harpaz N, Itzkowitz S, Harris CC, Rotter V, Gorgoulis VG, Oren M. Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(5):634-46.
50. Schulz-Heddergott R, Stark N, Edmunds SJ, Li J, Conradi LC, Bohnenberger H, Ceteci F, Greten FR, Dobbelsstein M, Moll UM. Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant p53 in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. *Cancer Cell*. 2018;34(2):298-14.e7.

51. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
52. Wang D, DuBois RN. Role of prostanoids in gastrointestinal cancer. *J Clin Invest*. 2018;128(7):2732-42.
53. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253-68.
54. Bonavita E, Bromley CP, Jonsson G, Pelly VS, Sahoo S, Walwyn-Brown K, Mensurado S, Moeini A, Flanagan E, Bell CR, Chiang SC, Chikkanna-Gowda CP, Rogers N, Silva-Santos B, Jaillon S, Mantovani A, Reis e Sousa C, Guerra N, Davis DM, Zelenay S. Antagonistic Inflammatory Phenotypes Dictate Tumor Fate and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Immunity*. 2020;53(6):1215-29.e8.
55. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K, Yu GY, Osterreicher CH, Hung KE, Datz C, Feng Y, Fearon ER, Oukka M, Tessarollo L, Coppola V, Yarovinsky F, Cheroutre H, Eckmann L, Trinchieri G, Karin M. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012;491(7423):254-8.
56. Schwitalla S, Ziegler PK, Horst D, Becker V, Kerle I, Begus-Nahrman Y, Lechel A, Rudolph KL, Langer R, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Prazeres da Costa O, Neurath MF, Meining A, Kirchner T, Greten FR. Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. *Cancer Cell*. 2013;23(1):93-106.
57. Kim EH, Wong SW, Martinez J. Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death Differ*. 2019;26(1):25-40.
58. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(8):554-67.
59. Ghiringhelli F, Fumet JD. Is There a Place for Immunotherapy for Metastatic Microsatellite Stable Colorectal Cancer? *Front Immunol*. 2019;10:1816.
60. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Hingorani SR, Hunter T, Hynes RO, Jain RK, Janowitz T, Jorgensen C, Kimmelman AC, Kolonin MG, Maki RG, Powers RS, Puré E, Ramirez DC, Scherz-Shouval R, Sherman MH, Stewart S, Tlsty TD, Tuveson DA, Watt FM, Weaver V, Weeraratna AT, Werb Z. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):174-86.
61. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, Lim YC, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, Goh KW, Hadi MA. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7):1732.
62. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 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.

63. Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(5.5):599-601.
64. Turski ML, Thiele DJ. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J Biol Chem*. 2009;284(2):717-21.
65. Chellan P, Sadler PJ. The elements of life and medicines. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2015;373(2037):20140182.
66. Michniewicz F, Saletta F, Rouaen JRC, Hewavisenti RV, Mercatelli D, Cirillo G, Giorgi FM, Trahair T, Ziegler D, Vittorio O. An Intracellular Achilles' Heel Allowing the Targeting of Epigenetics, Kinase Pathways, and Cell Metabolism in Cancer Therapeutics. *ChemMedChem*. 2021;16(15):2315-29.
67. Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*. 2016;35:107-15.
68. Wee NK, Weinstein DC, Fraser ST, Assinder SJ. The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(5):960-3.
69. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev*. 1996;96(7):2563-606.
70. Brewer GJ. Copper in medicine. *Curr Opin Chem Biol*. 2003;7(2):207-12.
71. Ge EJ, Bush AI, Casini A, Cobine PA, Cross JR, DeNicola GM, Dou QP, Franz KJ, Gohil VM, Gupta S, Kaler SG, Lutsenko S, Mittal V, Petris MJ, Polishchuk R, Ralle M, Schilsky ML, Tonks NK, Vahdat LT, Van Aelst L, Xi D, Yuan P, Brady DC, Chang CJ. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat Rev Cancer*. 2022;22(2):102-13.
72. Shanbhag V, Jasmer-McDonald K, Zhu S, Martin AL, Gudekar N, Khan A, Ladomersky E, Singh K, Weisman GA, Petris MJ. ATP7A delivers copper to the lysyl oxidase family of enzymes and promotes tumorigenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(14):6836-41.
73. Li Y. Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment. *IUBMB Life*. 2020;72(9):1900-08.
74. Gupta SK, Shukla VK, Vaidya MP, Roy SK, Gupta S. Serum and tissue trace elements in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1993;52(3):172-5.
75. Sharma K, Mittal DK, Kesarwani RC, Kamboj VP, Chowdhery. Diagnostic and prognostic significance of serum and tissue trace elements in breast malignancy. *Indian J Med Sci*. 1994;48(10):227-32.
76. Kaiafa GD, Saouli Z, Diamantidis MD, Kontoninas Z, Voulgaridou V, Raptaki M, Arampatzi S, Chatzidimitriou M, Perifanis V. Copper levels in patients with hematological malignancies. *Eur J Intern Med*. 2012;23(8):738-41.

77. Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, Auwerx J, Hanahan D. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(48):19507-12.
78. Vella V, Malaguarnera R, Lappano R, Maggiolini M, Belfiore A. Recent views of heavy metals as possible risk factors and potential preventive and therapeutic agents in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;457:57-72.
79. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*. 2017;387:95-105.
80. Brady DC, Crowe MS, Turski ML, Hobbs GA, Yao X, Chaikuad A, Knapp S, Xiao K, Campbell SL, Thiele DJ, Counter CM. Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature*. 2014;509(7501):492-6.
81. Voli F, Valli E, Lerra L, Kimpton K, Saletta F, Giorgi FM, Mercatelli D, Rouaen JRC, Shen S, Murray JE, Ahmed-Cox A, Cirillo G, Mayoh C, Beavis PA, Haber M, Trapani JA, Kavallaris M, Vittorio O. Intratumoral Copper Modulates PD-L1 Expression and Influences Tumor Immune Evasion. *Cancer Res*. 2020;80(19):4129-44.
82. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(1):88-94.
83. Martin F, Linden T, Katschinski DM, Oehme F, Flamme I, Mukhopadhyay CK, Eckhardt K, Tröger J, Barth S, Camenisch G, Wenger RH. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood*. 2005;105(12):4613-9.
84. Salvador F, Martin A, López-Menéndez C, Moreno-Bueno G, Santos V, Vázquez-Naharro A, Santamaria PG, Morales S, Dubus PR, Muínelo-Romay L, López-López R, Tung JC, Weaver VM, Portillo F, Cano A. Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(21):5846-59.
85. 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.
86. Rottenberg S, Disler C, Perego P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(1):37-50.
87. Lelièvre P, Sancey L, Coll JL, Deniaud A, Busser B. The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):3594.
88. Dai C, Xu Z, Huang F, Yu Z, Gao YF. Lewis acid-catalyzed, copper(II)-mediated synthesis of heteroaryl thioethers under base-free conditions. *J Org Chem*. 2012;77(9):4414-9.
89. Jiang Y, Huo Z, Qi X, Zuo T, Wu Z. Copper-induced tumor cell death mechanisms and antitumor theragnostic applications of copper complexes. *Nanomedicine (Lond)*. 2022;17(5):303-24.
90. Denoyer D, Clatworthy SAS, Cater MA. Copper Complexes in Cancer Therapy. *Met Ions Life Sci*. 2018;18:/books/9783110470734/9783110470734-022/9783110470734-022.xml.

91. Drew DA, Cao Y, Chan AT. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):173-86.
92. Wu JJ, Yuan XM, Huang C, An GY, Liao ZL, Liu GA, Chen RX. Farnesyl thiosalicylic acid prevents iNOS induction triggered by lipopolysaccharide via suppression of iNOS mRNA transcription in murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2019;68:218-25.
93. Nikolic M, Mijajlovic M, Jevtic V, Ratković Z, Novakovic S, Bogdanovic G, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2016;1116:264–71.
94. Živanović AS, Bukonjić AM, Jovanović-Stević S, Bogojeski J, Čočić D, Bijelić AP, Ratković ZR, Volarević V, Miloradović D, Tomović DL, Radić GP. Complexes of copper(II) with tetradentate S,O-ligands: Synthesis, characterization, DNA/albumin interactions, molecular docking simulations and antitumor activity. *J Inorg Biochem*. 2022;233:111861.
95. Radić GP, Gloović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LR, Ratković ZR, Valkonen A, Rissanen A, Trifunović SR. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids: crystal structure of the bis(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)2]. *Polyhedron*. 2012; 31(1):6.
96. Weir CE, Schroeder RA. Infrared Spectra of the Crystalline Inorganic Borates. *J Res Natl Bur Stand A Phys Chem*. 1964;68A(5):465-87.
97. Swaminathan K, Busch D. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1961; 20(1-2):159-63.
98. Godiksen A, Stappen FN, Vennestrøm PNR, Giordanino F. Coordination Environment of Copper Sites in Cu-CHA Zeolite, *J Phys Chem*. 2014; 118:23126–38.
99. Thakurta S, Roy P, Rosair G, Gómez-García CJ, Garribba E, Mitra S. Ferromagnetic exchange coupling in a new bis(μ -chloro)-bridged copper(II) Schiff base complex: Synthesis, structure, magnetic properties and catalytic oxidation of cycloalkanes, *Polyhedron*. 2009; 28:695-702.
100. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-methyl derivative of thiosalicylic acid, *Polyhedron*. 2014; 79:80-7.
101. Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater*. 2016;72(Pt 2):171-9.
102. 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.
103. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptopoulou CP, Psycharis V, Beavers CM, Teat SJ, Psomas G, Stamatatos TC. First palladium(II) and platinum(II) complexes from employment

of 2,6-diacetylpyridine dioxime: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological evaluation. *Inorg Chem.* 2012;51(14):7699-710.

104. Rizvi MA, Zaki M, Afzal M, Mane M, Kumar M, Shah BA, Srivastav S, Srikrishna S, Peerzada GM, Tabassum S. Nuclear blebbing of biologically active organoselenium compound towards human cervical cancer cell (HeLa): in vitro DNA/HSA binding, cleavage and cell imaging studies. *Eur J Med Chem.* 2015;90:876-88.

105. Kelly JM, Tossi AB, McConnell DJ, OhUigin C. A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(17):6017-34.

106. Casnati A, Barbosa S, Rouquette H, Schwing-Weill MJ, Arnaud-Neu F, Dozol JF, Ungaro R. New efficient calixarene amide ionophores for the selective removal of strontium ion from nuclear waste: synthesis, complexation, and extraction properties. *J Am Chem Soc.* 2001;123(49):12182-90.

107. Patra A, Sen TK, Ghorai A, Musie GT, Mandal SK, Ghosh U, Bera M. Synthesis, structure, spectroscopic characterization, and protein binding affinity of new water-soluble hetero- and homometallic tetranuclear [Cu(II)2Zn(II)2] and [Cu(II)4] clusters. *Inorg Chem.* 2013;52(6):2880-90.

108. Pasternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry.* 1983;22(10):2406-14.

109. Qu X, Chaires JB. Analysis of drug-DNA binding data. *Methods Enzymol.* 2000;321:353-69.

110. Raja DS, Bhuvanesh NS, Natarajan K. Effect of N(4)-phenyl substitution in 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde semicarbazones on the structure, DNA/protein interaction, and antioxidative and cytotoxic activity of Cu(II) complexes. *Inorg Chem.* 2011;50(24):12852-66.

111. Li DD, Tian JL, Gu W, Liu X, Yan SP. A novel 1,2,4-triazole-based copper(II) complex: synthesis, characterization, magnetic property and nuclease activity. *J Inorg Biochem.* 2010;104(2):171-9.

112. Jiang M, Li YT, Wu ZY, Liu ZQ, Yan CW. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activities and DNA-binding properties of new binuclear copper(II) complexes bridged by N,N'-bis(N-hydroxyethylaminoethyl)oxamide. *J Inorg Biochem.* 2009;103(5):833-44.

113. Saha S, Majumdar R, Roy M, Dighe RR, Chakravarty AR. An iron complex of dipyrrophenazine as a potent photocytotoxic agent in visible light. *Inorg Chem.* 2009;48(6):2652-63.

114. Li L, Guo Q, Dong J, Xu T, Li J. DNA binding, DNA cleavage and BSA interaction of a mixed-ligand copper(II) complex with taurine Schiff base and 1,10-phenanthroline. *J Photochem Photobiol B.* 2013;125:56-62.

115. Paitandi RP, Gupta RK, Singh RS, Sharma G, Koch B, Pandey DS. Interaction of ferrocene appended Ru(II), Rh(III) and Ir(III) dipyrinato complexes with DNA/protein, molecular docking and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2014;84:17-29.

116. Motojyuku M, Saito T, Akieda K, Otsuka H, Yamamoto I, Inokuchi S. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;875(2):509-14.
117. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-40.
118. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):197.
119. Grem JL, McAtee N, Balis F, Murphy R, Venzon D, Kramer B, Goldspiel B, Begley M, Allegra CJ. A phase II study of continuous infusion 5-fluorouracil and leucovorin with weekly cisplatin in metastatic colorectal carcinoma. *Cancer.* 1993;72(3):663-8.
120. Planting AS, van der Burg ME, van den Bent MJ, de Boer-Dennert M, Stoter G, Verweij J. Phase II study of a short course of weekly high-dose cisplatin combined with long-term oral etoposide in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1996;73(10):1265-7.
121. Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Lee JT, Nathanson KL, Medina CA, Flaherty KT, Herlyn M. Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels. *Br J Cancer.* 2007;96(3):445-9.
122. Fu J, Xu Y, Yang Y, Liu Y, Ma L, Zhang Y. Aspirin suppresses chemoresistance and enhances antitumor activity of 5-Fu in 5-Fu-resistant colorectal cancer by abolishing 5-Fu-induced NF- κ B activation. *Sci Rep.* 2019;9(1):16937.
123. Fernandez HR, Lindén SK. The aspirin metabolite salicylate inhibits lysine acetyltransferases and MUC1 induced epithelial to mesenchymal transition. *Sci Rep.* 2017;7(1):5626.
124. Paterson JR, Lawrence JR. Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer. *QJM.* 2001;94(8):445-8.
125. Mateyak MK, Obaya AJ, Sedivy JM. c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol.* 1999;19(7):4672-83.
126. Zhang X, Hu F, Li G, Li G, Yang X, Liu L, Zhang R, Zhang B, Feng Y. Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):25.
127. Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q, Lin J, Tan S, Tian Y, Liao Q, Cao D. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;9(70):33403-15.
128. Roudi R, Barodabi M, Madjd Z, Roviello G, Corona SP, Panahei M. Expression patterns and clinical significance of the potential cancer stem cell markers OCT4 and NANOG in colorectal cancer patients. *Mol Cell Oncol.* 2020;7(5):1788366.
129. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(10):653-67.
130. Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP. Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2009;15(7):777-91.

131. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC and Alberts SR. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(1):23-30.
132. Krasnovskaya O, Naumov A, Guk D, Gorelkin P, Erofeev A, Beloglazkina E, Majouga A. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3965.
133. Mijajlović MŽ, Nikolić MV, Tomović DLj, Bukonjić AM, Kočović A, Jevtić VV, Ratković ZR, Klisurić O, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis and characterization of platinum(IV)- complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the S-butyl derivative of thiosalicylic acid. *Serbian J Exp Clin Res.* 2017; 18(3):195–201.
134. Mijajlović MŽ, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Simović Marković B, Volarević V, Arsenijević NN, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of palladium(II) complexes with alkyl derivatives of thiosalicylic acids. Crystal structure of the bis(S- butyl-thiosalicylate)palladium(II) complex, [Pd(S-bu-thiosal)2]. *Polyhedron.* 2015; 90:34-40.
135. Benazic S, Silconi ZB, Jevtovic A, Jurisevic M, Milovanovic J, Mijajlovic M, Nikolic M, Kanjevac T, Potočňák I, Samoľová E, Ratkovic ZR, Radic G, Milovanovic M, Pantic J, Arsenijevic N, Radosavljevic GD. The Zn(S-pr-thiosal)2 complex attenuates murine breast cancer growth by inducing apoptosis and G1/S cell cycle arrest. *Future Med Chem.* 2020;12(10):897-914.
136. Besser Silconi Z, Benazic S, Milovanovic J, Jurisevic M, Djordjevic D, Nikolic M, Mijajlovic M, Ratkovic Z, Radić G, Radisavljevic S, Petrovic B, Radosavljevic G, Milovanovic M, Arsenijevic N. DNA binding and antitumor activities of platinum(IV) and zinc(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem.* 2018; 43:719–29.
137. Walencik PK, Stokowa-Sołtys K, Wieczorek R, Komarnicka UK, Kyzioł A, Jeżowska-Bojczuk M. Impact of the Cu(II) ions on the chemical and biological properties of goserelin - coordination pattern, DNA degradation, oxidative reactivity and in vitro cytotoxicity. *J Inorg Biochem.* 2017;175:167-78.
138. Basaran E, Gamze Sogukomerogullari H, Cakmak R, Akkoc S, Taskin-Tok T, Köse A. Novel chiral Schiff base Palladium(II), Nickel(II), Copper(II) and Iron(II) complexes: Synthesis, characterization, anticancer activity and molecular docking studies. *Bioorg Chem.* 2022;129:106176.
139. Gouda AM, El-Ghamry HA, Bawazeer TM, Farghaly TA, Abdalla AN, Aslam A. Antitumor activity of pyrrolizines and their Cu(II) complexes: Design, synthesis and cytotoxic screening with potential apoptosis-inducing activity. *Eur J Med Chem.* 2018;145:350-59.
140. Kordestani N, Amiri Rudbari H, Fernandes AR, Raposo LR, Luz A, Baptista PV, Bruno G, Scopelliti R, Fateminia Z, Micale N, Tumanov N, Wouters J, Abbasi Kajani A, Bordbar AK. Copper(ii) complexes with tridentate halogen-substituted Schiff base ligands: synthesis, crystal structures and investigating the effect of halogenation, leaving groups and ligand flexibility on antiproliferative activities. *Dalton Trans.* 2021;50(11):3990-4007.

141. O'Connor M, Kellett A, McCann M, Rosair G, McNamara M, Howe O, Creaven BS, McClean S, Kia AF, O'Shea D, Devereux M. Copper(II) complexes of salicylic acid combining superoxide dismutase mimetic properties with DNA binding and cleaving capabilities display promising chemotherapeutic potential with fast acting in vitro cytotoxicity against cisplatin sensitive and resistant cancer cell lines. *J Med Chem.* 2012;55(5):1957-68.
142. Gianferrara T, Bratsos I, Alessio E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. *Dalton Trans.* 2009;(37):7588-98.
143. Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death Dis.* 2016;7(1):e2058.
144. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003;17(20):2481-95.
145. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001;292(5517):727-30.
146. Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science.* 1997;275(5302):983-6.
147. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205–19.
148. Ruiz MC, Perelmutter K, Levín P, Romo AIB, Lemus L, -Fogolín MB, León IE, Di Virgilio AL. Antiproliferative activity of two copper (II) complexes on colorectal cancer cell models: Impact on ROS production, apoptosis induction and NF- κ B inhibition. *Eur J Pharm Sci.* 2022;169:106092.
149. Arikrishnan S, Loh JS, Teo XW, Bin Norizan F, Low ML, Lee SH, Foo JB, Tor YS. Ternary Copper (II) Complex Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022;22(5):999-1011.
150. Ali A, Mishra S, Kamaal S, Alarifi A, Afzal M, Saha KD, Ahmad M. Evaluation of catacholase mimicking activity and apoptosis in human colorectal carcinoma cell line by activating mitochondrial pathway of copper(II) complex coupled with 2-(quinolin-8-ylxy)(methyl)benzotrile and 8-hydroxyquinoline. *Bioorg Chem.* 2021;106:104479.
151. Vančo J, Trávníček Z, Hošek J, Malina T, Dvořák Z. Copper(II) Complexes Containing Natural Flavonoid Pomiferin Show Considerable In Vitro Cytotoxicity and Anti-inflammatory Effects. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7626.
152. Komarnicka UK, Starosta R, Płotek M, de Almeida RF, Jeżowska-Bojczuk M, Kyzioł A. Copper(I) complexes with phosphine derived from sparfloxacin. Part II: a first insight into the cytotoxic action mode. *Dalton Trans.* 2016;45(12):5052-63.
153. Chen T, Yang I, Irby R, Shain KH, Wang HG, Quackenbush J, Coppola D, Cheng JQ, Yeatman TJ. Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Res.* 2003;63(15):4368-74.
154. Iacopetta B . TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 2003;21:271–6.

155. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell*. 2002;1(3):289-98.
156. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999;104(3):263-9.
157. Niotis A, Tsiambas E, Fotiades PP, Ragos V, Polymeneas G. ki-67 and Topoisomerase IIa proliferation markers in colon adenocarcinoma. *J BUON*. 2018;23(7):24-7.
158. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
159. Sazonova EV, Petrichuk SV, Kopeina GS, Zhivotovsky B. A link between mitotic defects and mitotic catastrophe: detection and cell fate. *Biol Direct*. 2021;16(1):25.
160. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23(16):2825–37.
161. Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, Marumoto T, Ushio Y, Saya H. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene*. 2004;23(39):6548-58.
162. Ding Q, Zhang W, Cheng C, Mo F, Chen L, Peng G, Cai X, Wang J, Yang S, Liu X. Dioscin inhibits the growth of human osteosarcoma by inducing G2/M-phase arrest, apoptosis, and GSDME-dependent cell death in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2020;235(3):2911-24.
163. Ramakrishnan S, Rajendiran V, Palaniandavar M, Periasamy VS, Srinag BS, Krishnamurthy H, Akbarsha MA. Induction of cell death by ternary copper(II) complexes of L-tyrosine and diimines: role of coligands on DNA binding and cleavage and anticancer activity. *Inorg Chem*. 2009;48(4):1309-22.
164. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):883-90.
165. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*. 2003;348(10):891-9.
166. Logan RFA, Grainge MJ, Shepherd VC, Armitage NC, Muir KR, ukCAP Trial Group. Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 2008;134(1):29–38.
167. Ishikawa H, Mutoh M, Suzuki S, Tokudome S, Saida Y, Abe T, Okamura S, Tajika M, Joh T, Tanaka S, Kudo SE, Matsuda T, Iimuro M, Yukawa T, Takayama T, Sato Y, Lee K, Kitamura S, Mizuno M, Sano Y, Gondo N, Sugimoto K, Kusunoki M, Goto C, Matsuura N, Sakai T, Wakabayashi K. The preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on

the development of colorectal tumours in Asian patients: a randomised trial. *Gut*. 2014;63(11):1755-9.

168. Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sørensen HT. Low-dose aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drug use and colorectal cancer risk: a population-based, case-control study. *Ann Intern Med*. 2015;163(5):347–55.

169. García Rodríguez LA, Soriano-Gabarró M, Bromley S, Lanás A, Cea Soriano L. New use of low-dose aspirin and risk of colorectal cancer by stage at diagnosis: a nested case-control study in UK general practice. *BMC Cancer*. 2017;17(1):637.

170. Aoki T, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP2 signaling as a node of chronic inflammation in the colon tumor microenvironment. *Inflamm Regen*. 2017;37:4.

171. Ma X, Aoki T, Tsuruyama T, Narumiya S. Definition of prostaglandin E2–EP2 signals in the colon tumor microenvironment that amplify inflammation and tumor growth. *Cancer Res*. 2015;75(14):2822–32.

172. Wang D, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*. 2010;29(6):781–88.

173. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E2–EP4 signaling promotes immune inflammation through TH1 cell differentiation and TH17 cell expansion. *Nat Med*. 2009;15(6):633–40.

174. Sheibanie AF, Yen J-H, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R, Ganea D. The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23→IL-17 axis. *J Immunol*. 2007;178(12):8138–47.

175. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med*. 2007;356(21):2131–42.

176. Voronov E, Apte RN. IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer. *Cancer Microenviron*. 2015;8(3):187–200.

177. Wang Y, Wang K, Han GC, Wang RX, Xiao H, Hou CM, Guo RF, Dou Y, Shen BF, Li Y, Chen GJ. Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal Immunol*. 2014;7(5):1106–15.

178. Zins K, Abraham D, Sioud M, Aharinejad S. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res*. 2007;67(3):1038–45.

179. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*. 2008;118(2):560–70.

180. Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Wildi S, Müller C, Graber H, Schilling M, Büchler MW. Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(1):76-81.

181. Huang WC, Chan ST, Yang TL, Tzeng CC, Chen CC. Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular

and functional study of novel alpha-methylene-gamma-butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis*. 2004;25(10):1925-34.

182. Dymicka-Piekarska V, Kemono H. Does colorectal cancer clinical advancement affect adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin and ICAM-1) concentration? *Thromb Res*. 2009;124(1):80-3.

183. Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res*. 2006;12(23):7165-73.

184. Schellerer VS, Langheinrich M, Hohenberger W, Croner RS, Merkel S, Rau TT, Stürzl M, Naschberger E. Tumor-associated fibroblasts isolated from colorectal cancer tissues exhibit increased ICAM-1 expression and affinity for monocytes. *Oncol Rep*. 2014;31(1):255-61.

185. Ionescu C, Braicu C, Chiorean R, Cojocneanu Petric R, Neagoe E, Pop L, Chira S, Berindan-Neagoe I. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with SMAD3 gene expression levels: a pilot study. *J Gastrointest Liver Dis*. 2014;23(4):413-8.

186. Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, Nishino H, Hirakawa K. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer*. 2005;41(12):1802-10.

187. Gho YS, Kim PN, Li HC, Elkin M, Kleinman HK. Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res*. 2001;61(10):4253-7.

188. Qiu Z, Wang Y, Zhang Z, Qin R, Peng Y, Tang W, Xi Y, Tian G, Zhang Y. Roles of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in colorectal cancer: expression, functions, prognosis, tumorigenesis, polymorphisms and therapeutic implications. *Front Oncol*. 2022;12:1052672.

БИОГРАФИЈА:

Јелена Д. Димитријевић, рођена Миљковић, рођена је 26.11. 1978. године у Крагујевцу. Основну школу у Баточини и средњу школу у Крагујевцу завршила је са одличним успехом. Основне студије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу је завршила је 2009. године и стекла звање дипломирани биолог-еколог. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2014/2015 године, изборно подручје Матичне ћелије у биомедицинским наукама и положила све испите предвиђене програмом студија, укључујући и усмени докторски испит 31.05.2017. године са оценом 9 (девет), чиме је остварила просечну оцену студија 9,33 (девет и 33/100).

Од 12.07.2021. па до данас је запослена на пословима биолога у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, Одсек цитогенетске дијагностике, Одељење контроле фертилитета Клинике за гинекологију и акушерство.

БИБЛИОГРАФИЈА

- **Dimitrijević J**, Arsenijević AN, Milovanović MZ, Arsenijević NN, Milovanović JZ, Stanković AS, Bukonjić AM, Tomović DL, Ratković ZR, Potočňák I, Samořová E, Radić GP. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of binuclear copper(II)-complexes with some S-isoalkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-isopropyl derivative of thiosalicylic acid. *J Inorg Biochem.* 2020;208:111078. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111078.
- Velickovic M, Arsenijevic A, Acovic A, Arsenijevic D, Milovanovic J, **Dimitrijevic J**, Todorovic Z, Milovanovic M, Kanjevac T, Arsenijevic N. Galectin-3, Possible Role in Pathogenesis of Periodontal Diseases and Potential Therapeutic Target. *Front Pharmacol.* 2021;12:638258. doi: 10.3389/fphar.2021.638258.
- Zornic S, Lukovic B, Jevtovic A, **Dimitrijevic JD**, Simovic Markovic B, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N. Overview of host defense peptides with promising anti-breast cancer activity. *Ser J Exp Clin Res.* 2021;doi: <https://doi.org/10.2478/sjecr-2021-0052>

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„ Антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине“

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,

У Крагујевцу, 2023. године,


потпис аутора

Образац 2

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

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

„Антигуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима
тиосалицилне киселине“

истоветне.

У Крагујевцу, 2023. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Д. Димитријевић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„ Антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-изоалкил дериватима тиосалицилне киселине“

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

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

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 наведени докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 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, 2023. 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/>