



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ивана Р. Васић

**ЦИТОТОКСИЧНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ
КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ
КАРЦИНОМА КОЛОНА МИША**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Ivana R. Vasić

**CITOTOKSIČNOST DINUKLEARNIH
KOMPLEKSA PLATINE(II) U
EKSPERIMENTALNOM MODELU
KARCINOMA KOLONA MIŠA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Ivana R. Vasić

**CYTOTOXICITY OF PLATINUM(II) DINUCLEAR
COMPLEXES IN AN EXPERIMENTAL MODEL
OF MICE COLUMN CANCER**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Идентификациона страница докторске дисертације

I Аутор
Име и презиме: Ивана Васић
Датум и место рођења: 1. 5. 1979. године, Крагујевац
Садашње запошљење: Универзитетски клинички центар Крагујевац, Служба за фармацеутску здравствену делатност
II Докторска дисертација
Наслов: ЦИТОТОКСИЧНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ КАРЦИНОМА КОЛОНА МИША
Број страница: 110
Број слика: 22
Број библиографских података: 239
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Клиничка и експериментална фармакологија
Ментор: Проф. др Марија Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија
III Оцена и одбрана
Датум пријаве тезе: 6. 9. 2017. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-747/4, 6. 9. 2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Марија Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник2. Проф. др Гордана Радић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан3. Проф. др Тибор Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан4. Проф. др Драган Манојловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Аналитичка хемија, члан5. Проф. др Вера Дондур, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физичка хемија, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Марија Миловановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник2. Проф. др Божидар Чобелић, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Неорганска хемија, члан3. Доц. др Душан Томовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
Датум одбране дисертације:

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

I Autor
Ime i prezime: Ivana Vasić
Datum i mesto rođenja: 1. 5. 1979. godine, u Kragujevcu
Sadašnje zapošljenje: Univerzitetski klinički centar Kragujevac, Služba za farmaceutsku zdravstvenu delatnost
II Doktorska disertacija
Naslov: Citotoksičnost dinuklearnih kompleksa platine(II) u eksperimentalnom modelu karcinoma kolona miša
Broj stranica: 110
Broj slika: 22
Broj bibliografskih podataka: 239
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Klinička i eksperimentalna farmakologija
Mentor: Prof. dr Marija Živković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Organska hemija
III Ocena i odbrana
Datum prijave teze: 6. 9. 2017. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: IV-03-747/4, 6. 9. 2017. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Marija Milovanović, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, predsednik 2. Prof. dr Gordana Radić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, član 3. Prof. dr Tibor Sabo, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija, član 4. Prof. Dr Dragan Manojlović, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Analitička hemija, član 5. Prof. dr Vera Dondur, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fizička hemija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Marija Milovanović, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, predsednik 2. Prof. dr Božidar Čobeljić, vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Neorganska hemija, član 3. Doc. dr Dušan Tomović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, član
Datum odbrane disertacije:

Identification page of the doctoral dissertation

I Author
Name and surname: Ivana Vasić
Date and place of birth: 1. 5. 1979. Kragujevac
Current employment: University Clinical Center Kragujevac, Department of Hospital Pharmacy
II Doctoral dissertation
Title: Cytotoxicity of platinum(II) dinuclear complexes in an experimental model of mice column cancer
Number of pages:110
Number of images:22
Number of bibliographic data:239
Institution and place where the dissertation was prepared: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific field (UDK): Clinical and experimental pharmacology
Mentor: Prof. Dr Marija Živković, associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Organic Chemistry
III Assessment and defense
Dissertation application date: 6. 9. 2017.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation theme: IV-03-747/4, 6. 9. 2017.
Commission for evaluation of the scientific basis of the theme and the fulfillment of the candidate's requirements:
<ol style="list-style-type: none">1. Prof. Dr. Marija Milovanović, full professor of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and Immunology, president2. Prof. Dr. Gordana Radić, full professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pharmaceutical Chemistry, member3. Prof. Dr. Tibor Sabo, full professor of the Faculty of Chemistry at the University of Belgrade for the narrower scientific field of General and Inorganic Chemistry, member4. Prof. Dr. Dragan Manojlović, full professor of the Faculty of Chemistry of the University of Belgrade for the narrow scientific field of Analytical Chemistry, member5. Prof. Dr. Vera Dondur, full professor of the Faculty of Medicine of the University of Kragujevac for the narrow scientific field of Physical Chemistry, member
Commission for evaluation and defense of doctoral dissertation:
<ol style="list-style-type: none">1. Prof. Dr. Marija Milovanović, full professor of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and Immunology, president2. Prof. Dr. Božidar Čobeljić, associate professor of the Faculty of Chemistry at the University of Belgrade for the narrower scientific field of Inorganic Chemistry, member3. Asst. Dušan Tomović, assistant professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pharmaceutical Chemistry, member
Date of defense of dissertation:

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација представља још једну степену мог професионалног и личног развоја и желим да се искрено захвалим људима који су били са мном на овом путу.

Пре свега желим да захвалим мом изузетном ментору, проф. др Марији Живковић, без чије посвећености, залагања, знања и упорности, ове докторске дисертације не би ни било.

Захваљујем проф. др Марији Миловановић, на помоћи у спровођењу експерименталних истраживања везаних за имунохемијске анализе, као и бројним саветима приликом писања дела дисертације који се на њих односио.

Желела бих да се захвалим проф. др Небојши Арсенијевићу, редовном професору, на корисним саветима, сугестијама и великој помоћи и подршци током трајања докторских студија.

Изузетну захвалност дугујем и драгим професорима и колегама са Катедре за фармакологију и токсикологију ФМН у Крагујевцу, Института за хемију ПМФ-а у Крагујевцу и Института за молекуларну медицину и матичне ћелије ФМН у Крагујевцу, који су ми помагали на професионалном плану.

Докторску дисертацију посвећујем својој породици. Родитељима, који су ме са много љубави подржавали током студија и улагали напоре како бих стекла образовање. Брату Душану, са жељом да му будем добар пример.

Највећу захвалност дугујем супругу Ивану и ћерки Круни, који су били и остали моја вечна инспирација.

САЖЕТАК

Увод: Синтетисано је девет динуклеарних комплекса платине(II) опште формуле $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}^{2+}$, где је L координовани амински/диамински лиганд, а X мостни лиганд пиразин (pz) или пиридазин (pydz).

Материјал и методе: Карактеризација комплекса је извршена елементалном микроанализом, инфрацрвеном, ултраљубичастом и нуклеарно-магнетно-резонантном спектроскопијом. Цитотоксична, митотска и пролиферативна активност испитивана је МТТ тестом, анализом ћелија обојених Annexin-ом V и пропидијум-јодидом, анти-Ki67 антителима и анализом ћелијског циклуса. Одређен је антитуморски потенцијал комплекса у експерименталном моделу карцинома колона миша морфометријским одређивањем запремине тумора. Издвојени су јетра, плућа и мозак за хистопатолошку анализу, а у серуму животиња одређена је концентрација трансаминаза, урее и креатинина.

Резултати: Комплекси платине(II), Pt1 и Pt7, *in vitro* заустављају деобу СТ26 ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса док осталих седам комплекса Pt(II) заустављају у G0/G1. Сви ови комплекси имају дозно зависни и временски зависни цитотоксични ефекат на вијабилност СТ26 ћелијске линије и значајно повећавају проценат ћелија у касној апоптози. Комплекси платине Pt1 и Pt2 апликовани интраперитонеално *in vivo* смањују прогресију и раст примарног карцинома колона сингених BALB/c мишева након субкутане апликације СТ26 ћелија и проценат ткива захваћеног метастазама у јетри и плућима, а не испољавају значајан токсични ефекат у бубрезима и јетри.

Закључак: Испитивани комплекси платине(II) имају потенцијал да постану прототип лекова у терапији карцинома колона, показујући значајан антитуморски ефекат у односу на стандардну терапију цисплатином и оксалиплатином, без повећања токсичности на јетру и бубреге.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: динуклеарни комплекси платине(II), СТ26, карцином колона, IR спектроскопија, NMR спектроскопија, МТТ тест, оксалиплатина

ABSTRACT

Introduction: Platinum(II) complexes type of $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\mu\text{-X})\}^{2+}$ (where L is a bidentately coordinated diamine ligand and X is a bridging pyrazine (pz) or pyridazine (pydz) ligand) were synthesized.

Material and methods: The structure of the complexes was determined by elemental microanalysis, infrared, ultraviolet and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. Cytotoxic, mitotic and proliferative activity was investigated by MTT test, by Annexin V analysis of cells stained and propidium iodide, anti-KI67 antibody and cell cycle analysis. The potential antitumor effect was determined in an experimental mouse colon cancer model by morphometric measurement of its volume. The liver, lungs and brain were isolated for histopathological analysis and the concentration of transaminases, urea and creatinine was measured in the serum of the animals.

Results: Complexes Pt1 and Pt7 *in vitro* stop the division of CT26 cells in the G2/M phase of the cell cycle while the other seven Pt(II) complexes stop it in G0/G1, and all these complexes have a dose and time-dependent cytotoxic effect on the viability of the CT26 cell line and significantly increase percentage of cells in late apoptosis. Complexes Pt1 and Pt2 applied intraperitoneally *in vivo* reduce the progression and growth of primary colon cancer of syngeneic BALB/c mice after subcutaneous application of CT26 cells and the percentage of tissue affected by metastases in the liver and lungs, and do not manifest significant toxic effects to the kidneys and liver.

Conclusion: Synthesized platinum(II) complexes have the potential to become prototype drugs in the treatment of colon cancer, showing a significant antitumor effect compared to standard therapy (cisplatin and oxaliplatin), without increasing toxicity to the liver and kidneys.

KEY WORDS: platinum(II) dinuclear complexes, CT26, colon cancer, IR and NMR spectroscopy, MTT test, oxaliplatin

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. КОМПЛЕКСИ ЈОНА МЕТАЛА У ТЕРАПИЈИ	1
1.1.1. Мононуклеарни комплекси платине (II) прве и друге генерације	2
1.1.1.1. Механизам дејства цисплатине	6
1.1.1.2. Глутатионски систем за детоксикацију	6
1.1.2. Полинуклеарни комплекси платине (II) III генерације	7
1.2. РЕЗИСТЕНЦИЈА НА АНТИНЕОПЛАСТИКЕ И ЊЕНИ МЕХАНИЗМИ ...	15
1.2.1. Механизми ћелијске смрти	15
1.2.1.1. Молекуларна основа апоптозе (тип I ћелијске смрти)	15
1.2.1.1.1. Улога протеина фамилије Bcl-2 у регулацији апоптозе	16
1.2.1.1.2. Улога протеина p53 у регулацији апоптозе	17
1.2.1.2. Аутофагија (тип II ћелијске смрти)	18
1.2.1.3. Некроза (тип III ћелијске смрти)	18
1.2.2. Утицај антинеопластика на ћелијски циклуси ћелијску смрт	19
1.2.3. Иmunски одговор на малигно трансформисане ћелије	20
1.3. КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ	22
1.3.1. Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома	22
1.3.2. Новине у терапији колоректалног карцинома	23
1.3.2.1. Адјувантна хемотерапија и радиотерапија колоректалног карцинома	25
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	26
2.1. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	26
2.2. РАДНА ХИПОТЕЗА ИСПИТИВАЊА	27
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	28
3.1. ХЕМИКАЛИЈЕ И РЕАГЕНСИ	28
3.2. СИНТЕЗА ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II)	28
3.2.1. Синтеза полазних мононуклеарних [Pt (L) Cl ₂] комплекса	28
3.2.2. Синтеза динуклеарних {[Pt (L) Cl] ₂ (X) } Cl ₂ комплекса	29
3.3. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II)	29
3.3.1. Елементална микроанализа	29
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија	30
3.3.3. UV-Vis спектрофотометрија	30
3.3.4. Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија	30
3.4. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА <i>in vitro</i>	30
3.4.1. Ћелијске културе	30
3.4.2. Припрема раствора комплекса	31
3.4.3. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест за испитивање цитотоксичног деловања	31
3.4.4. Квантитативно испитивање апоптотске смрти AnnexinV-FITC тестом	31
3.4.5. Процена пролиферативне способности мерењем експресије Ki-67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом	32
3.4.6. Анализа ћелијског циклуса	32

3.5. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА <i>in vivo</i>	33
3.5.1. Експерименталне животиње	33
3.5.2. Експериментални модел карцинома дебелог црева	33
3.5.3. Процена раста хетеротопског карцинома дебелог црева	34
3.5.4. Хистопатолошка анализа метастаза	34
3.5.5. Испитивање токсичности комплекса	35
3.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	35
4. РЕЗУЛТАТИ	36
4.1. СИНТЕЗА ПОЛАЗНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ [Pt (L) Cl ₂] КОМПЛЕКСА	36
4.2. СИНТЕЗА ДИНУКЛЕАРНИХ {[Pt (L) Cl] ₂ (X) }Cl ₂ КОМПЛЕКСА	36
4.3. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИНТЕТИСАНИХ ДИНУКЛЕАРНИХ Pt (II) КОМПЛЕКСА	37
4.4. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА Pt1–Pt9 КОМПЛЕКСА НА ОСНОВУ IR СПЕКТРОСКОПИЈЕ	39
4.5. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА Pt1–Pt9 КОМПЛЕКСА НА ОСНОВУ UV СПЕКТРОСКОПИЈЕ	40
4.6. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА Pt1–Pt9 КОМПЛЕКСА НА ОСНОВУ ¹ H и ¹³ C NMR СПЕКТРОСКОПИЈЕ	40
4.6.1. Стабилност динуклеарних {[Pt (L) Cl] ₂ (X) }Cl ₂ комплекса	50
4.7. ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ <i>in vitro</i>	51
4.7.1. Цитотоксичност комплекса платине (II) испитана МТТ тестом	51
4.7.2. Квантитативно испитивање ћелија обојених Annexin V-FITC-ом	53
4.7.3. Испитивање антипролиферативног ефекта мерењем експресије Ki67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом на СТ26 ћелијама	55
4.7.4. Анализа ћелијског циклуса	56
4.8. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ <i>in vivo</i>	57
4.8.1. Комплекси платине 1 и 2 утичу на раст примарног тумора	58
4.8.2. Комплекси платине 1 и 2 испољавају антиметастатско дејство	59
4.8.3. Комплекси платине 1 и 2 не испољавају токсичност	63

5. ДИСКУСИЈА	64
5.1. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ДИНУКЛЕАРНИХ Pt (II) КОМПЛЕКСА, Pt1–Pt9	65
5.1.1. ¹ H MR спектроскопска анализа Pt1–Pt9 комплекса	66
5.1.2. UV-Vis спектрофотометријска карактеризација Pt1–Pt9 комплекса	68
5.1.3. IR спектроскопска карактеризација Pt1–Pt9 комплекса	68
5.2. СТАБИЛНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ {[Pt (L) Cl]₂ (X) }Cl₂ КОМПЛЕКСА ...	68
5.3. ЦИТОТОКСИЧНА И МИТОТСКА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ <i>in vitro</i>	69
5.3.1. Комплекси платине (II) Pt1-Pt9 смањују вијабилност ћелија карцинома колона миша	70
5.3.2. Комплекси платине (II) Pt1-Pt9 изазивају апоптотску смрт СТ26 ћелија	70
5.3.3. Комплекси платине (II) Pt1-Pt7 испољавају антипролиферативни ефекат на СТ26 ћелијама	71
5.3.4. Комплекси платине (II) Pt1-Pt9 изазивају поремећаје ћелијског циклуса	71
5.4. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ (II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ <i>in vivo</i>	72
5.4.1. Комплекси платине 1 и 2 смањују раст примарног тумора	72
5.4.2. Комплекси платине 1 и 2 смањују метастазирање примарног тумора	72
5.4.3. Комплекси платине 1 и 2 не испољавају токсичност у јетри и бубрезима	73
6. ЗАКЉУЧАК	74
7. ЛИТЕРАТУРА	76

1. УВОД

Канцер је комплексно, генетски модификовано обољење соматских ћелија које, ако доспе у касну фазу, прелази у системску болест организма. Малигно ткиво настаје умножавањем изворне туморске ћелије као последица узастопне деобе, мутирања нових клонова ћелија и њихове природне селекције. Малигни тумори представљају хетерогене популације канцерских ћелија међу којима постоји велика генетска разноликост (1). У туморима су присутне и нормалне ћелије и екстраћелијски матрикс (2).

Иако су међусобно врло различити, сви малигни тумори имају заједничке особине: одржавање сигнала за деобу ћелија, неосетљивост на сигнале који заустављају раст ћелија, неограничен потенцијал за репликацију, избегавање апоптозе, подстицај ангиогенезе, инвазивност и метастазирање (3). Мутација протоонкогена и тумор супресора доводи до повећаног метастатског потенцијала, док промена у генима одговорним за очување стабилности генома, а посебно хромозомска нестабилност, за последицу има резистенцију на дејство хемотерапеутика (4). Ово је стечена или адаптивна резистенција, која неретко доводи и до повећаног броја нежељених реакција на лек. Вишеструка резистенција настаје услед смањене акумулације лека у ћелији (повећано избацавање из ћелије помоћу мембранских транспортера), промена у циљном молекулу и систему детоксикације, брзе репарације ДНК, као и услед изостанка апоптозе (5). Присуство вишеструке резистенције на већи број структурно и функционално различитих хемотерапеутика битна је карактеристика бројних малигнух тумора. Проналазак нових терапеутика, примењених самостално или у комбинацији са стандардном терапијом, је и даље једина стратегија за превазилажење вишеструке укрштене резистенције на ову врсту лекова.

1.1. КОМПЛЕКСИ ЈОНА МЕТАЛА У ТЕРАПИЈИ

Медицинска неорганска хемија је релативно млада научна дисциплина. Јони одређених прелазних метала и њихови комплекси имају своју примену у медицини као терапеутици (цитостатици, антимицробни агенси, антивиротици, антиартритици, радиотерапеутици), као дијагностичка и контрастна средства.

Најчешће коришћени и испитивани антитуморски лекови последњих година су комплекси јона прелазних метала платине (Pt), злата (Au), рутенијума (Ru), родијума (Rh), осмијума (Os), и титанијума (Ti). Централни јони метала, који су носиоци позитивног нелектрисања, се лако везују за негативно наелектрисане биомолекуле, протеине и нуклеинске киселине. Комплекс који се примењује је најчешће „пролек” који пролази кроз трансформацију *in vivo* пре него што стигне на циљно место деловања (6). „Пролек” је дериват лека који се трансформише у организму у активан облик, са бољим фармакокинетичким особинама. Трансформације могу укључивати редукцију или оксидацију јона метала, супституцију лиганда или реакције самог лиганда. За успешност дејства комплекса јона метала као антитуморских агенаса најважнији је правилан избор лиганда који играју главну улогу у промени реактивности, липофилности и растворљивости, у стабилизацији оксидационог стања и контроли реакција супституције.

За дизајн антитуморских лекова на бази платине (Pt), кључни су термодинамика (распоред лиганда, *trans* утицаји) и кинетика (степен супституције лиганда, енергија

активације). Јасно је да и јон метала и лиганди одређују биолошку активност (7). Да би одређени комплекс платине имао цитотоксичну активност, одлазећи лиганди морају бити у *cis* положају, од аминских лиганда мора да садржи примарне или секундарне аминске или да има две аминок групе у *cis* положају (8).

1.1.1. Мононуклеарни комплекси платине(II) прве и друге генерације

Открићем антитуморских особина цисплатина (*cis*-диаминдихлоридоплатина(II)) почела је његова примена у медицини. Први пут у литератури цисплатин помиње Пирон (*M.Peyrone*) из Торина давне 1845. године (9), али Розенберг (*B.Rosenberg*) и сарадници са Универзитета у Мичигену су први открили 1965. године њену антипролиферативну активност на одређеним врстама саркома и лимфома код мишева (10, 11). Користећи амонијачни пуфер и платинске електроде, приметили су изостанак деобе у култури ћелија *Escherichia-e coli*, док се њен раст и даље одвијао. Случајно су открили да је једињење које се формирало током електролизе, цисплатин (*cis*-диаминдихлоридоплатина(II)) одговорна за овај феномен, а не дејство електричног поља. Откривено је тада да *trans* изомер цисплатина, (*trans*-диаминдихлоридоплатина(II)) не показује антитуморску активност.

Прве клиничке студије су спроведене 1971. године, а од 1979. године је цисплатина у клиничкој употреби (првобитног назива платинол) за лечење тумора јајника и тестиса (12, 13). Цисплатин је данас регистрована као лек који се сам или у комбинацији са другим цитостатским лековима користи за следеће индикације:

- терапија цервикалног карцинома на месту поновног јављања или удаљених метастаза,
- терапија метастазирајућег и локалног карцинома ендометријума,
- терапија карцинома тестиса, као део полихемотерапијског начина лечења,
- као компонента комбиноване хемотерапије код узнапредовалог карцинома оваријума,
- терапија микроћелијског карцинома плућа, зависно од стадијума болести (као компонента полихемотерапијског режима лечења, уз хируршку и радиолошку терапију),
- комбинована терапија узнапредовалог карцинома плућа (у присуству неоперабилних израслина и уз примену радиолошке терапије),
- као компонента комбиноване хемотерапије код узнапредовалог карцинома езофагуса,
- као компонента хеморадиотерапије код неметастазирајућег карцинома езофагуса,
- карциноми у пределу главе и врата (терапија код рекуренције или удаљених метастаза, у комбинацији са радиотерапијом код неоперабилног узнапредовалог локализованог карцинома који раније није лечен монотерапијом),
- узнапредовали карцином мокраћне бешике (као компонента полихемотерапије),
- адјувантна и неадјувантна комбинована хемотерапија остеосаркома. (12)

Антитуморски ефекат цисплатина је дозно зависан, али повећање концентрације доводи до ћелијске смрти не само канцерских већ и здравих ћелија у организму. Нежељена дејства приликом примене цисплатина су бројна, као што су нефротоксичност и неуротоксичност, али и кардиотоксичност, ототоксичност и

хепатотоксичност, затим мучнина и опадање косе (14-17). Многи тумори су по природи резистентни на цисплатин (урођена резистенција), док други то постају током терапије (18, 19). Како би се смањила токсичност и повећала растворљивост, последњих година синтетисан је велики број нових комплекса платине(II), једињења која су структурно слична цисплатину (класични комплекси), као и једињења који се структурно разликују од цисплатина (некласични комплекси) (20). Некласични комплекси платине отварају једно ново поље за проналазак нових комплексних једињења платине чији се механизам деловања разликује од механизма деловања цисплатина (21, 22).

Карбоплатин и оксалиплатин су класични комплекси платине I генерације регистровани као цитостатици, који се јако често користе у клиничкој пракси. Карбоплатин (диамин-1, 1-циклобутанд и карбоксилато-О, О'-платина(II)), уместо хлоридо групе има анјон циклобутандикарбоксилне киселине који је мање реактиван у цитоплазми и самим тим има мању нефротоксичност од цисплатина (23). Карбоплатин, раствор за инфузију, сам или у комбинацији са другим антинеопластима, је индикуван за терапију следећих малигних тумора:

- карцином јајника,
- микроћелијски карцином плућа,
- сквамозелуларни карцином главе и врата,
- карцинома цервикса са присуством локалног релапса или удаљених метастаза. (12).

Најчешће нежељено дејство карбоплатина је неутропенија, док дужа примена лека доводи и до неуротоксичности, нефротоксичности, ототоксичности, кардиотоксичности и хепатотоксичности (24).

Лек оксалиплатин (*cis*- (*L*-диаминциклохексан) оксалатоплатина(II)) се примењује у терапији карцинома дебелог црева (лечење III стадијума карцинома дебелог црева након потпуног одстрањивања примарног тумора) и у терапији метастатског карцинома дебелог црева и ректума (завршни део дебелог црева) (12). Оксалиплатин се примењује код оних облика карцинома колоне који су резистентни на дејство цисплатина (25). Боље је растворна у води у поређењу са цисплатином и због тога остварује интензивније интеракције са РНК и протеинима. Најчешћи нежељени ефекти овог лека су неуротоксичност, као и неутропенија, пулмотоксичност, нефротоксичност, ототоксичност и хепатотоксичност (26).

И један и други комплекс имају нешто бољу растворљивост у води у односу на цисплатин, али проблем резистенције и даље је присутан.

У локалној употреби у појединим земљама су једињења хептаплатин, лобаплатин и недаплатин.

Хептаплатин је регистрована у Јужној Кореји од 2005.године за третман карцинома желуца (26).

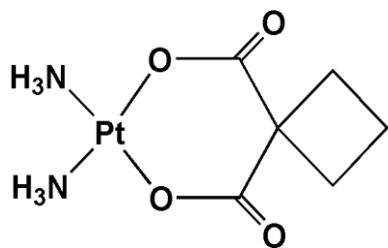
Лобаплатин се од 2004. године у Републици Кини користи за лечење микроћелијског карцинома плућа, метастатског тумора дојке и хроничне мијелоидне леукемије (27).

Недаплатин се од 1996. године у Јапану користи за карцином главе и врата, тестиса, немикроћелијског карцинома плућа, тумор грлића материце и јајника (28). Овај комплекс има хелатни лиганд, гликолку киселину, али мању нефротоксичност и неуротоксичност, иако има сличан механизам дејства као карбоплатин и цисплатин (29).

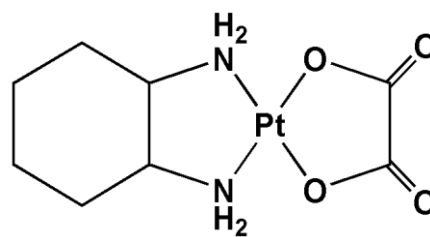
Многи комплекси, иако су показали добре резултате, још увек су само у фази клиничких студија. Испитивање пикоплатина је у трећој фази клиничких студија за лечење микроћелијског карцинома плућа (30). Обзиром на чињеницу да се комплекси

платине(IV), у организму редукују до комплекса платине(II) (31), који затим испољавају антитуморску активност, ипроплатин, комплексно једињење платине(IV), (32) се налази у другој фази клиничких испитивања, као агенс који се потенцијално може применити орално у хемотерапији. Ароплатин је комплекс који се налази у другој фази клиничких студија (**Слика 1**) (33).

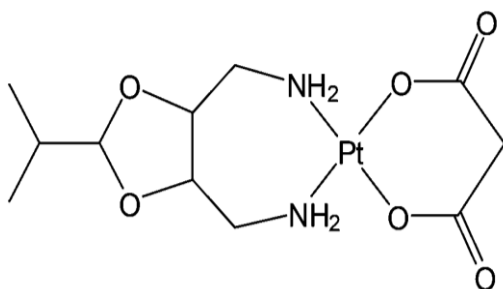
Многа једињења која су показала добре резултате у предклиничким испитивањима нису нашла клиничку примену јер показују токсичност *in vivo*, недовољну антитуморску активност и лошу растворљивост.



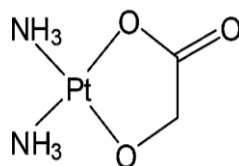
карбоплатин



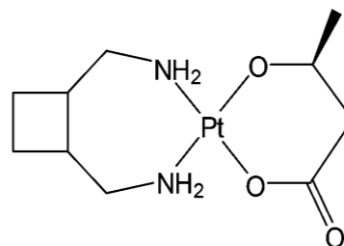
оксалиплатин



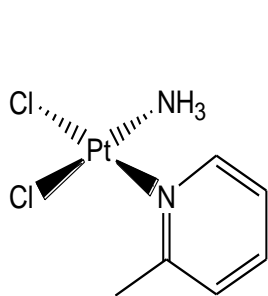
хептаплатин



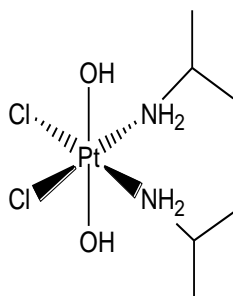
недаплатин



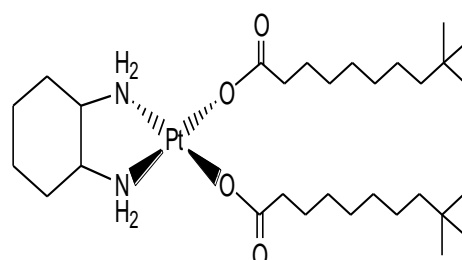
лобаплатин



пикоплатин



ипроплатин



ароплатин

Слика 1. Комплекси платине који се користе као хемотерапеутици.

Испитивани комплекси платине(II) показују ужи спектар деловања и мању резистентност у односу на комплексе платине који се налазе у клиничкој употреби (34), мада вишеструка резистенција и даље представља највећи проблем у клиничкој пракси.

1.1.1.1. Механизам дејства цисплатина

Прва претпоставка била је да је цисплатин неутралан молекул који улази у ћелију пасивном дифузијом. Касније је откривено да је механизам уласка овог молекула активан транспорт посредством плазмамембранског бакар Ctr1 транспортера (35). Цисплатин доспева до ћелије тумора као неутралан комплекс. У првој фази један хлоридо лиганд супституише се молекулом воде при чему се формира $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$. Вода је у односу на хлоридо лиганд боља одлазећа група тако да је овај позитиван јон врло реактиван (36). Позитивно наелектрисани продукти хидролизе цисплатина у ћелији реагују са ДНК што доводи до антитуморске активности. У следећој фази долази до даље супституције хлоридо група молекулима воде, а затим даље хидролизе, при чему настају неутрални хидроксидо комплекси платине(II), који не могу даље да реагују са ДНК (37).

Антитуморска активност цисплатина базира се на реакцији са ДНК у једру ћелије формирањем ковалентних веза са базама нуклеотида. (38, 39). При физиолошкој рН вредности, антитуморска активност цисплатина у највећој мери (60 до 65%) потиче од интраланчаног 1,2-d (GpG) умрежавања платине(II) за ДНК, знатно мање (0 до 25%) од интраланчаног 1,2-d (GpA) координовања, а нешто више од 1% је присутно интерланчано 1,3-d (GpXpG) умрежавања, као и интраланчано 1,3-d (GpXpG) координовање (40).

Везивање цисплатина за ДНК узрокује нарушавање њене спиралне структуре, што зауставља репликацију и транскрипцију ДНК (41-46). Ови поремећаји доводе до апоптозе, односно програмиране ћелијске смрти. Апоптоза изостаје, тј. настаје резистенција, што је већа способност ћелије да репарира оштећења ДНК.

1.1.1.2. Глутатионски систем за детоксикацију

Молекул цисплатина се приликом уласка у ћелију најчешће везује за фосфолипиде који су сатавни део ћелијске мембране. У ћелијама постоје и многи други биомолекули који могу реаговати са цисплатином, попут молекула РНК. Такође, бројни протеини и пептиди који у структури имају тиолне ($-\text{SH}$), или тиоетарске ($-\text{SCH}_3$) групе, реагују са цисплатином (47-51). Глутатион је непротеински тиол који реагује са цисплатином тако што доводи до стварања мање токсичног и више растворљивог коњугата (52). Након дифундовања цисплатина у ћелију, тиолна група цистеина из глутатиона и металотионеина се координује за јон Pt(II) и спречава интеракцију Pt(II) са ДНК (48). Ову реакцију катализује ензим глутатион-S-трансфераза (GSH). Настали коњугати се избацују из ћелије активним транспортом помоћу АТФ-зависне пумпе (GS-X пумпе) (53, 54).

Након дужег дозирања цисплатин у организму пацијената доводи до повећања нивоа глутатиона и металотионеина у крви (55, 56). Ове промене у оквиру глутатионског система детоксикације инхибирају антитуморску активност цисплатина, стварају резистентност и изазивају њено токсично деловање. (57). Глутатион-S-трансферазе (GSH) су група ћелијских ензима који су распрострањени у цитоплазми и митохондријама. Цитоплазматска изоформа μ је одговорна за стварање GSH коњугата са цитостатиком, а прекомерна експресија GSH- μ доводи до резистенције на супстрат за овај ензим, као што је случај са цисплатином. Дакле, прекомерна експресија ензима

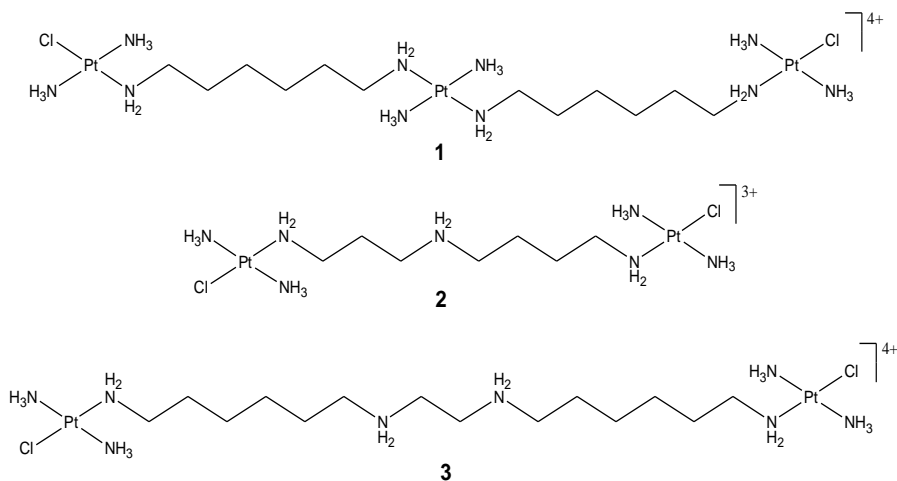
укључених у синтезу GSH, као и повећан ниво GSH у ћелији, такође могу довести до појаве резистенције. (56).

Подаци из литературе показују да се мање од 1% молекула цисплатина може везати за молекул ДНК који се налази у једру, а заправо више од 99% овог молекула гради одређену врсту везе са другим биомолекулима у ћелији (58, 59) што је доказ велике неселективности овог молекула.

1.1.2. Полинуклеарни комплекси платине(II) III генерације

Комплексима III генерације припадају полинуклеарни комплекси платине(II) (60). Ови комплекси су једињења од два или више јона метала међусобно повезаних флексибилним мостним лигандима, као што су алифатични диамини (61-67) или крутим мостним лигандима, као што су молекули азола и азина (67-70). Полинуклеарни комплекси платине(II) имају већу растворљивост у односу на неутралне мононуклеарне комплексе, јер се у води налазе у облику катјона. (71). Ови комплекси су интересантни јер са молекулом ДНК формирају карактеристичне продукте који се структурно разликују од оних које формира цисплатина. Динуклеарни комплекси платине(II) постоје као *cis*- и *trans*-изомери, при чему су се *trans*-изомери показали као активнији у реакцијама са ДНК.

Полинуклеарни комплекси платине(II) (BBR комплекси, који у мосту садрже алифатичне диамине) реагује са ДНК брже, и везују се на другачији начин у односу на цисплатину (64, 72, 73). Показало се да ови комплекси заустављају G2/M фазу ћелијског циклуса код глиома, док цисплатин индукује апоптозу. (74). Први полинуклеарни платина(II) комплекс који је испитан (слика 2, комплекс 1, BBR3464) није прошао II фазу клиничких студија. Овај тринуклеарни комплекс, не показује антитуморску активност на ћелијама канцера *in vivo*, иако се *in vitro* показао реактивнијим од цисплатина (75). Динуклеарни комплекси 2 (BBR3571) и 3 (BBR3610) (слика 2), садрже полиамин као мостни лиганд и показали су слично антиканцерогено дејство као комплекс 1. Комплекс 3 има јаче цитотоксично дејство на ћелијским линијама HCT-116, DLD1, SW480 и HT29 карцинома дебелог црева у односу на комплекс 1, цисплатин и оксалиплатин. Истраживања су показала да позитивно наелектрисани полинуклеарни комплекси платине граде ковалентне и нековалентне везе са негативно наелектрисаним фосфолипидима ћелијске мембране. (72)



Слика 2. Формуле полинуклеарних комплекса платине(II) са: полиаминским мостним лигандима (комплекс **1**, **2** и **3**), супституисаном амино групом у полиаминском мостном лиганду (комплекс **4** и **5**) и дериватом антрахинона (комплекс **6**).

Пошто су наведени комплекси показали малу терапијску ширину у клиничким студијама, синтетисани су комплекси са супституисаном амино групом мостним лигандима. Ова једињења су мање реактивна у *in vitro* условима, али су у стању да ослобађају супституисане групе у *in vivo* условима (Слика 2).

Комплекси **4** и **5** (BBR3537) (слика 2) представљају “пролек” који се у организму трансформише до комплекса **2** (BBR3571, слика 2). Мања цитотоксичност комплекса **4** и **5** није последица њихове хидролизе при физиолошком рН, већ томе доприноси блокирање амино групе. Комплекси **3** и **4** се везују за ДНК 90% односно 74%, док се комплекс **2** везује 33% а цисплатин само 6% (76). Оба комплекса, такође, показују мањи афинитет према хуманом албумину у серуму у односу на комплексе **1** и **2** (77).

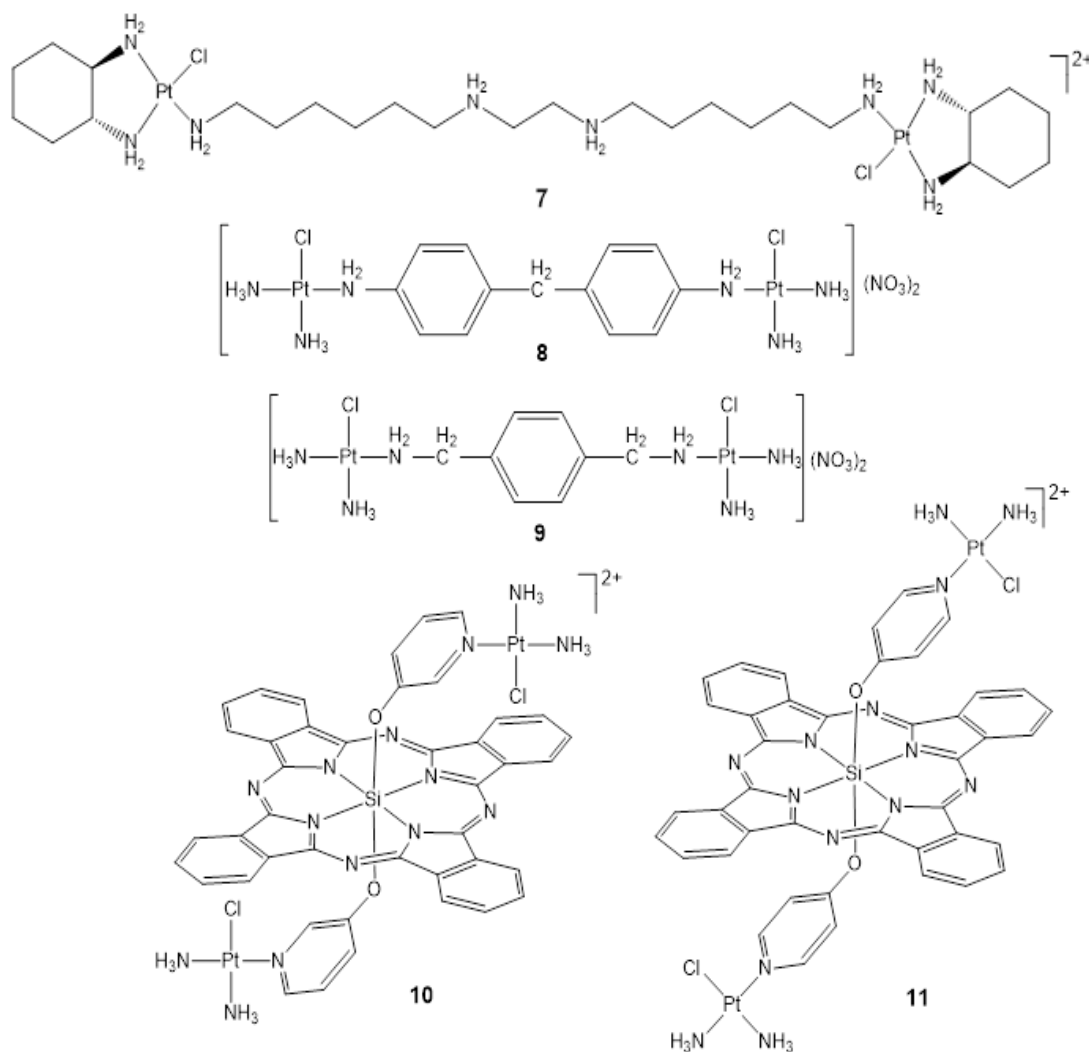
Динуклеарни комплекс Pt(II) **6** (слика 2) у структури садржи аминоксил ланац различите дужине и антрахинон, који има особину флуоресценције. Комплекс **6** показује високо цитотоксично дејство на А2780 ћелијској линији хуманог карцинома оваријума. (7)

Показало се да се полинуклеарни комплекси платине(II) са 1,1/*trans,trans* структуром разлажу у присуству нуклеофила који садрже сумпор, што доводи до повећања токсичности у организму. Ознака 1,1 се односи на број одлазећих група са

јона Pt(II), а *trans,trans* или *cis,cis* је геометрија у односу на мостни лиганд. Замена хлоридо група сумпор донорским лигандима, може да доведе до елиминације мостног полиаминског лиганда услед *trans* ефекта атома сумпора, док код комплекса који имају 1,1/*cis,cis* геометрију не долази до елиминације (78). Реакције 1,1/*cis,cis* динуклеарних комплекса платине(II) су показале да са тиолном групом из GSH настаје стабилни GS-макрохелат (79), док у реакцији са тиоетарским атомом сумпора из *N*-ацетил-*L*-метионина, настају различити динуклеарни комплекси платине (II). (80).

Динуклеарни комплекс платине(II) **7** (слика 3) је дериват оксалиплатина који садржи бидентатно координован 1,2-диаминоциклохексан. У односу на комплекс **3** (слика 2), овај комплекс садржи бидентатно координовани диамински лиганд, спречен је *trans*-ефекат и не долази до раскидања везе Pt(II) -мостни лиганд. Активност ових комплекса у организму још увек није испитана (81).

Динуклеарни комплекси Pt(II) **8** и **9** (слика 3) показали су већу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог аденокарцинома плућа A549 у односу на цисплатин, при чему је комплекс **8** знатно активнији. Реакције комплекса **8** са GSH су веома споре због стерног ефекта ароматичног мостног лиганда, али се показало да у реакцијама са сумпор донорским молекулима не долази до раскидања везе Pt(II) -мостни лиганд. Код комплекса **8** лако долази до 1,3- и 1,4-интраланчаног везивања са молекулом ДНК. Овај комплекс има већу способност везивања за ДНК у односу на комплекс **9**, који првенствено формира 1,4-интраланчане везе. Може се закључити да мостни лиганд има кључни утицај на цитостатичку активност динуклеарних комплекса платине(II). Динуклеарни комплекси Pt(II) **10** и **11** (слика 3) садрже и фотодинамички агенс Si(IV) -фталоцијанин и показали су високу цитотоксичност на HeLa ћелијској линији хуманог рака грлића материце (82).



Слика 3. Динуклеарни комплекси Pt(II) са 1,2-диаминоциклохексаном и полиаминским мостним лигандом (комплекс **7**), 1,1/*cis,cis* монофункционалних динуклеарних комплекса Pt(II) (**8**, **9**, **10** и **11**).

Полинуклеарни комплекси платине(II) **12** и **13** (слика **4**) као мостне лиганде садрже алифатичне полиамине спермидин и спермин (83). Ови комплекси показују високу антиканцерогену активност према HeLa ћелијској линији хуманог карцинома јајника и HSC-3 ћелијској линији хуманог карцинома сквамозних ћелија језика. (84).

У синтези динуклеарних комплекса Pt(II) као нефлексибилни мостни лиганди могу се користити и молекули азина (85). Динуклеарни комплекси Pt(II) који као мостне лиганде садрже диазине, супститисане деривате пиразина (комплекс **14**, слика **4**), показали су знатно већу антитуморску активност на WIDR ћелијским линијама хуманог карцинома дебелог црева и на IGROV ћелијским линијама хуманог карцинома јајника, у односу на цисплатин. Ови комплекси су показали и веома високу цитотоксичност према L1210 ћелијској линији леукемије код мишева, која је резистентна на цисплатин (86, 87).

Слика 4. Полинуклеарни комплекси платине(II) који као мостни лиганд садрже алифатичне полиамине спермидин (комплекс **12**) и спермин (комплекс **13**), диазин (комплекс **14**) и пиразол (комплекс **15**).

Динуклеарни комплекс Pt(II) **15** (слика **4**), као мостни лиганд садржи пиразол и јон OH^- као одлазећи лиганд. Комплекс **15** има око 40 пута већу антитуморску активност на MCF-7 ћелијској линији хуманог карцинома дојке у односу на цисплатин. Такође, активан је *in vitro* на ћелијским линијама резистентним на цисплатин. Овај комплекс реагује спорије са ДНК и са овим молекулом формира интраланчани 1,2-d (GpG) адукт. (88, 89). Крути мостни лиганд, пиразол, одржава одговарајућу удаљеност између два центра платине за везивање два суседна гуанина.

Тринуклеарни 3*N*-хелатни монофункционални комплекс Pt(II) **16** (слика **5**) у својој структури има мостни лиганд који је мање флексибилан у односу на алифатичне полиамине, али флексибилнији је у односу на диазине и диазоле. Захваљујући флексибилности мостног лиганда и његовој величини, комплекс **16** са молекулом ДНК формира интра- и интер- ланчане адукте. У поређењу са цисплатином комплекс **16**

показује бољу антитуморску активност на Р-388 ћелијској линији леукемије код мишева и А549 ћелијској линији хуманог аденокарцинома плућа (90). Полинуклеарни комплекси **17** и **18** (слика 5) са крутим мостним лигандима имају ограничену флексибилност. Оба комплекса показују антитуморску активност на ћелијским линијама НерG2 хуманог хепатома и НТ29 хуманог колоректалног карцинома, при чему је комплекс **17** мање активан у односу на комплекс **18**.

Слика 5. Полинуклеарни комплекси платине(II) са различитим мање флексибилним и крутим мостним лигандима.

Тринуклеарни комплекси **19-21** (слика 6) су деривати ВВР3464 комплекса (**1**) али имају један или два аминска лиганда на централном јону метала. Они формирају интерланчане GrG везе са молекулом ДНК захваљујући додатним нековалентним везама лиганда на централном јону метала. Комплекси **19** и **20** показују већу антитуморску активност на ћелијским линијама хуманог карцинома јајника А2780, А2780dsR и А2780ZD0473R у односу на цисплатин. Међутим, ови комплекси су јако нестабилни и у ћелији брзо долази до њиховог разлагања (91-93).

Слика 6. Тринуклеарни комплекси платине(II)

Тринуклеарни комплекс Pt(II) **22** (TriplatinaNC) (**слика 6**) је дериват комплекса VBR3464 (**1**), али су код њега хлоридо лиганди супституисани са 1,6-диаминохексаном (NH₂(CH₂)₆NH₂). Овај комплекс гради искључиво нековалентне везе са молекулом ДНК, које су од великог значаја за цитотоксичност комплекса (94, 95). Комплекс **22** показује антитуморску активност на ћелијским линијама хуманог карцинома јајника (96).

Синтетисани су и неконвенционални полинуклеарни комплекси платине(II) са различитим мостним лигандима (**слика 7**). Комплекси **23** и **24** (**слика 7**) показују већу антитуморску активност у односу на конвенционалне хемотерапеутике на ћелијским линијама хуманог карцинома јетре HepG2 и хуманог аденокарцинома плућа AGZY-83. Комплекс **23** се везује за молекул ДНК ковалентном везом, али постоје и нековалентне интеракције. Тетрануклеарни комплекс Pt(II) **25** (**слика 7**) везује се за хумани албумин хидрофобним и електростатичким везама услед чега је ћелијска апсорпција овог комплекса око 20 пута већа у односу на цисплатин (97).

Комплекс **26** (**слика 7**) показује антитуморску активност на хуманим ћелијским линијама HL-60 леукемије, HCT-8 карцинома дебелог црева, MCF-7 карцинома дојке, BGC-823 карцинома желуца и EJ карцинома бешике, знатно већу у односу на цисплатин или карбоплатин. Комплекс показује значајну активност на ћелијским линијама A2780 карцинома оваријума и HCT-116 карцинома колоне код мишева (98).

Слика 7. Неконвенционални полунуклеарни комплекси платине(II)

1.2. РЕЗИСТЕНЦИЈА НА АНТИНЕОПЛАСТИКЕ И ЊЕНИ МЕХАНИЗМИ

1.2.1. Механизми ћелијске смрти

Ћелијска смрт, заједно са растом и диференцијацијом, је суштински део животног циклуса ћелије. Ћелијска смрт настаје када биолошка ћелија престане да обавља своје функције. Ово може бити резултат физиолошког процеса умирања старих ћелија, или може бити резултат деловања различитих физичких и хемијских фактора или микроорганизама (99).

На основу морфолошких карактеристика разликује се три врсте ћелијске смрти: 1) тип I ћелијске смрти или апоптоза, 2) тип II ћелијске смрти или аутофагија и 3) тип III ћелијске смрти или некроза. Постоји и неколико атипичних модела ћелијске смрти. Класификација постоји и на основу ензимских карактеристика (ћелијска смрт са и без различитих класа протеаза), имунских карактеристика (имуногена или не-имуногена ћелијска смрт) и функционалних карактеристика. (100, 101).

1.2.1.1. Молекуларна основа апоптозе (тип I ћелијске смрти)

Улогу ћелијске смрти у развоју организма први пут су описали педесетих и шездесетих година прошлог века *A. Glucksmann* и *J.V. Saunders*. Први доказ за постојање два морфолошка различита типа ћелијске смрти дао је аустралијски патолог Џон Кер (*J.F. Kerr*) 1965. године. Кер и сарадници су уочили постојање ћелија које вероватно умиру, али се по морфолошким карактеристикама разликују од ћелија које се налазе у процесу некрозе. Реч апоптоза потиче из грчког језика и значи опадање (лишћа са дрвећа) и тај термин уведен је први пут 1972 (102).

Апоптоза, као тип I програмиране ћелијске смрти, одвија се у неколико фаза. У раној фази долази до кидања међућелијских веза и кондензације цитоплазматских протеина што доводи до смањења запремине ћелије и њеног смежувања. Хроматин се кондензује у маргиналним деловима једра и оно добија облик потковице. Долази до фрагментације молекула ДНК, ослобађања цитохрома C из митохондрија, и у касној фази до цепања једра ћелије. Долази и до премештања фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну мембране (103). Транслокација калретикулина је такође неопходна у овој фази. Оваква ћелија се у завршној фази распада на већи број малих, мембраном обавијених делова, која се зову апоптотска тела. Апоптотска тела могу бити са или без хроматина. Макрофаги, дендритске и друге ћелије ова апоптотска тела фагоцитију (103).

Кључни догађај током процеса апоптозе представља каскадна реакција протеолитичке активације чланова фамилије ензима из групе каспаза (104). Каспазе су група цистеин протеаза које су аспартат-специфичне. Налазе су у свим ћелијама у неактивној форми проензима прокаспаза који се састоји од продомена различите дужине на N-крају протеина, велике субјединице (p20) и мале субјединице (p10) на C-крају протеина. Каспазе се активирају реакцијом на специфичне сигнале и унутрашњим протеолитичким процесом цепања покрећу активацију других прокаспаза. Процес се завршава формирањем хомодимерних протеаза које иницирају апоптозу. У ћелијама човека откривена је фамилија ензима каспаза од 14 чланова који се разликују по својим физиолошким улогама. Разликују се инфламаторне и апоптотске каспазе (105). Инфламаторне каспазе имају фундаменталну улогу у сазревању цитокина и инфламаторном одговору. У каспазе, покретаче апоптозе, спадају иницијаторске

каспазе, покретачи протеолизе (каспаза -8, -10, -2 и -9), и каспазе које су ефекторске (каспаза -3, -6 и -7) које садрже кратке продомене, са највише 30 аминокиселина (106). Каспазе, мимо апоптозе, имају и улогу у ћелијској пролиферацији, учествују у обради важних фактора у имунолошког система, као и у диференцијацији неких ћелија.

Процес покретања апоптозе у ћелији је условљен је активацијом спољашњег пута апоптозе (процесом преноса ванћелијских сигнала) или унутрашњег пута апоптозе (стрес услед деловања лекова и других токсичних једињења, топлоте, зрачења, хипоксије или вирусне инфекције). Постоје одређени молекули који учествују у покретању и једног и другог сигналног пута (107). Последњих година показано је да унутарћелијски сигнали могу индуковати процес апоптозе који је независан од каспаза. У неким ћелијама, процес апоптозе индукује се активацијом ендонуклеазе G и фактора AIF (*apoptosis-inducing factor*). Ова два протеина примарно се налазе у митохондријама. Након дејства унутарћелијског сигнала, они се из митохондрија транспортују у нуклеус. Ендонуклеаза G врши фрагментацију молекула ДНК. Осим тога, апоптозу индукују и перфорини и гранзими А или В.

Везивањем одговарајућих ванћелијских молекула за рецепторе смрти, процесом преноса сигнала спољашњим путем, активира се процес апоптозе. Најпознатији лиганди који се везују за рецепторе смрти су TNF- α (лиганд за TNFR 1 рецептор) и Fas (Fas L) лиганд (за рецептор Fas познат и под називима CD95 и APO-1). Fas рецептор је присутан на ћелијским мембранама различитих ћелија, укључујући и Т лимфоците и НК ћелије човека. Активација рецептора индукује интеракцију домена смрти рецептора са хомологним доменима смрти унутарћелијских протеина који се називају протеински адаптери. Домени смрти рецептора Fas интерагују са хомологним доменима протеинског адаптера који се назива протеин FADD (*Fas-associated death domain*). Протеини адаптери садрже и ефекторске домене смрти DED (*death effector domains*). Домени DED интерреагују са себи хомологним ефекторским доменима смрти ензима каспазе 8 и на тај начин формира се комплекс DISC (108).

1.2.1.1.1. Улога фамилије протеина Bcl-2 у регулацији апоптотског процеса

Фамилија протеина Bcl-2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*) кључни је унутарћелијски регулатор процеса апоптозе. Ова фамилија протеина се налази у мембранама митохондрија, ендоплазматског ретикулума и спољашњој мембрани нуклеуса. Отварање пора на спољашњој мембрани митохондрија покреће иреверзибилно ослобађање интрамембранских протеина, што активира каскаду каспаза и покреће апоптозу. Породица Bcl-2 протеина може се поделити у две главне групе: антиапоптотски протеини који имају инхибициони ефекат и проапоптотски протеини који имају активациони ефекат. Антиапоптотички Bcl-2 протеини укључују сам Bcl-2 протеин, као и сродне протеине A1, Bcl-XS, проширену изоформу Bcl-XL, Mcl-1 протеин, Bag итд. Проапоптотски Bcl-2 протеини се деле на ефекторске (Bax, Bok и Bak) и протеине који само садрже BH3 домен (Bik, Bad, Hrk, Puma, Noxa, Bid и Bim) (109).

Антиапоптотски протеини делују тако што инхибирају проапоптотске молекуле (110). Баланс проапоптотских и антиапоптотских протеина је најбитнији у регулацији унутрашњег пута апоптозе. Антиапоптотски протеини су везани за спољашњу страну мембране митохондрија. У физиолошким условима је мембрана стабилна и непропустљива. Под дејством BH3-*only* активатора долази до покретања проапоптотских Bax и Bak протеина, као и инхибиције антиапоптотских протеина.

Активни BНЗ-*only* облици директном димеризацијом уграђују Вах и Вах протеине у мембрану митохондрија. Ово доводи до повећане пропустљивости мембране митохондрија и долази до стварања пора (111). Након ослобађања цитохрома С кроз поре у цитоплазму, овај протеин везује апоптотички протеазно активирајући фактор-1 (Araf-1). Ова каскада догађаја доводи до активације каспаза и коначно апоптозе (112).

1.2.1.1.2. Улога протеина p53 у регулацији апоптозе

Протеин p53 откривен је 1979. године, 1989. *B.Vogelsteini* сарадници га класификују као тумор супресорни протеин, а већ 1993. проглашен је за “Молекул године” (113). Полуживот овог протеина је кратак (5 до 20 минута), а своју биолошку улогу испољава као регулаторни протеин процеса транскрипције ДНК. Улога протеина p53 у индукцији процеса апоптозе је двојака. Као активатор транскрипције учествује у регулацији експресије проапоптотских гена (Вах, Puma, Noxa, Araf-1). Поред тога, директном интеракцијом са протеином Bcl-XL фаворизује формирање димера протеина Вах (114).

Уколико је број оштећења на молекулу ДНК велики, протеин p53 индукује процес апоптозе. Када је протеин p53 на било који начин инактивиран (најчешће мутацијама), не долази до активације процеса апоптозе зависног од овог протеина. То је чест случај у ћелијама карцинома, што за резултат има агресивнији туморски раст (115).

Осим протеини фамилије Bcl-2 и протеина p53, у најзначајније модулаторе процеса апоптозе спадају протеински производи одређених онкогена и гена регулатора ћелијског циклуса, цитохром С, разни транскрипциони регулатори и поједине класе ензима фосфатаза и циклин зависних киназа (116).

1.2.1.2. Аутофагија (тип II ћелијске смрти)

Аутофагија је механизам којим ћелија отклања и разлаже сопствене функционалне или непотребне делове цитоплазме у лизозомима. Она обезбеђује алтернативни извор енергије ћелијама и на тај начин омогућава њихово преживљавање у одређеним ситуацијама (117). Постоје микроаутофагија, макроаутофагија и аутофагија посредована шеперонима СМА (*Chaperone mediated autophagy*) (118). Микроаутофагија подразумева неселективну пиноцитозу малих делова цитоплазме посредством мембране лизосома. Макроаутофагија подразумева спајање аутофагозома са лизозомом и формирање аутолизосома. Аутофагозом се састоји од ћелијског садржаја који се разлаже. Овај садржај је увијен двоструком мембраном спојених крајева. Аутолизозом даље разлаже делове ћелије под утицајем киселих лизозомалних ензима хидролаза (119). Шеперонима посредована аутофагија, до данас, је једино описана код сисара (120). Шеперони су посебни протеини, познати као молекуларни пратиоци, који помажу у савијању и увијању полипептидног ланца протеина.

1.2.1.3. Некроза (тип III ћелијске смрти)

За разлику од апоптозе, некроза се дефинише као пасиван процес који настаје под дејством нефизиолошких услова спољашње средине (механичка оштећења, токсини, вируси или хипоксија). Овај процес је енергетски независан, док је за одвијање апоптозе неходна енергија аденозин трифосфата (АТР). Главна морфолошка разлика ова два процеса је у томе што код некрозе долази до бубрења ћелијске мембране и лизе ћелије уз ослобађање лизозомских ензима који индукују инфламацију. За разлику од апоптозе, фрагментација ДНК код некрозе није униформна. Некроза се разликује од аутофагије по веома брзом губитку потенцијала на ћелијској мембрани, до које доводи промена у функцији јонских канала и јонских пумпи.

Морфолошки карактеристике некрозе ћелије су повећање запремине ћелије, бубрење органела, руптура ћелијске мембране и накнадни губитак унутар ћелијског садржаја (121). Услед губитка трансмембранског потенцијала унутрашње стране мембране митохондрија, отварају се митохондријалне поре и долази до престанка синтезе АТР-а. У некрози, као последица стварања реактивних медијатора кисеоника ROS (*Reactive oxygen species*) долази до повећане активације PARP1 (*Poly[ADP-ribose]polymerase 1*) протеина. Овај низ реакција доводи до инхибиције гликолизе и смањења синтезе АТР-а (122). У некрози долази и до повећања концентрације калцијума у цитоплазми (123), услед оксидативног стреса и разлагања липида (102, 124). Услед ослобађања калцијума из ендоплазматичног ретикулума и његовог уласка кроз мембрану ћелије долази до стварања пора у митохондријалној мембрани. Последица свега је активација калцијум зависних протеаза (без каспаза) и коначно некроза (125). Стварањем руптура на ћелијској мембрани долази до изливања целокупног ћелијског садржаја у околно ткиво што резултује појавом запаљења и оштећењем ткива.

Међутим, све већи број података из литературе указује да је некроза није стихијски процес, већ контролисан тип ћелијске смрти кога регулишу многобројни механизми и сигнални путеви. (126, 127). До некрозе може довести инхибиција респираторног ланца митохондрија, а може битин узрокована инхибицијом низа реакција који карактеришу апоптозу и аутофагију (128).

1.2.2. Утицај антинеопластика на ћелијски циклус и ћелијску смрт

Већина хемотерапеутика делује тако што оштећује ДНК и активира сложену мрежу сигнала која зауставља ћелијски циклус и покреће апоптозу (129, 130). Долази до експресије специфичних гена који учествују у регулацији ћелијског циклуса или репарацији ДНК. Цитостатици се могу поделити у две групе: циклус специфичне, који делују само у одређеној фази ћелијског циклуса и циклус неспецифичне, који испољавају своје дејство у свим фазама ћелијског циклуса (131, 132). У циклус неспецифичне цитостатике чије дејство није везано за одређену фазу ћелијског циклуса, спадају сви алкилирајући агенси као што су деривати платине, деривати нитрозоурее, азотни пликавци, бисулфан и дакарбазин (133). Ови лекови садрже алкил групе које могу стварати ковалентне везе са атомима азота у пуринским и пиримидинским базама нуклеинских киселина, у току репликације. Главни корак је стварање карбонијум јона, атома угљеника са шест електрона у спољном омотачу, који су веома реактивни и тренутно реагују са амино-, хидроксилним- или тиолним групама.

На крају долази до унакрсног везивања два ланца ДНК или погрешног упаривања база и на крају смрти ћелије.

Једна од главних особина канцерских ћелија је њихова способност избегавања апоптозе (134). Ћелије тумора могу да избегну апоптозу инхибицијом функција каспаза или непокретањем апоптозе (135).

Повећана експресија антиапоптотских Bcl-2 протеина и смањена експресија проапоптотских протеина Bax и/или Bak су најчешћи механизми избегавања апоптозе (136). Прекомерна експресија протеина Bcl-2 доводи до повећане отпорности ћелија тумора на стимулусе апоптозе индуковане антинеопластима. (137). Мутације гена за протеин Bcl-2 олакшавају генезу карцинома и регистроване су код више од половине свих врста тумора (135, 138). Негативна регулација проапоптотских гена, као и позитивна регулација антиапоптотских гена фамилије Bcl-2 смањује цитотоксични ефекат већине хемотерапеутика (5).

Једна од стратегија коју су канцерске ћелије развиле како би ограничиле и избегле апоптозу су мутације на гену за протеин p53 које се срећу код око половине тумора. Ове мутације најчешће доводе до настанка нефункционалног протеина и ћелија више није у могућности да заустави ћелијски циклус, поправи оштећења, нити да уђе у апоптозу (139). Нефункционални p53 протеин мења сензитивност ћелија тумора на хемотерапеутике и доводи и до настанка резистентног фенотипа (140). Исход активације тумор супресорског протеина p53 под дејством цитостатика је или апоптоза или заустављање ћелијског циклуса у G1 или G2 фази (115).

Одређени хемотерапеутици, као што су цисплатин, доксорубин, цитарабин и етопозид, изазивају апоптозу тако што активирају синтезу *FasL*, који се везује за *Fas* рецептор (141, 142). Ови лекови делују тако што доводе до повећања *iRNK* (информациона рибонуклеинска киселина) за синтезу *FasL* и *Fas* (143). Код тумора крви и солидних тумора, као што сунеуробластом, карцином колона и карцином дојке, цитотоксични лекови индукују експресију *FasL*, и након везивања за његов рецептор доводе до смрти ћелије (144).

Активација PI3K/Akt сигналног пута који учествују у регулацији процеса преживљавања може спречити покретање апоптозе и довести до развоја резистентног фенотипа. Овај сигнални пут инхибира проапоптотски протеин Bad, као и FOXO транскрипционе факторе који регулишу транскрипцију проапоптотских протеина *FasL* и *Bim*. Овај сигнални пут повећава и транскрипцију антиапоптотских гена Bcl-2 и Bcl-XL (145). Инактивација PTEN тумор супресора, кључног негативног регулатора PI3K/Akt сигналног пута, доводи до појаве тумора, али и до настанка резистенције код већ постојећих ћелија тумора (146). PTEN тумор супресор је кључни негативни регулатор PI3K/Akt сигналног пута, и најчешће је мутиран код тумора као што су глиобластом и карцином ендометријума, док се са мањом учесталашћу јављају мутације овог супресора код карцинома дојке, карцинома плућа и меланома (147).

Одређени број цитостатика покреће апоптозу повећањем пропустљивости митохондријалне мембране и ослобађањем цитохрома C у цитоплазму (144). Цитохром C активира каскаду ефекторских каспаза, које својим протеолитичким активностима покрећу апоптозу (148).

1.2.3. Иmunски одговор на малигно трансформисане ћелије

Иmunски систем има најважнију улогу препознавању клонова малигно трансформисаних ћелија и њиховом уклањању пре него што се настане малигнитет. Ћелије имунског система имају улогу у спречавању настанка хроничног

инфламацијског окружења погодног да се тумор развија (149). Телије имунског система препознају тумор-специфичне молекуле на канцерогеним ћелијама које организам својим механизмима касније одстрањује. Молекули нормалних ћелија исказују и тумор-асоциране антигене чија је експресија другачија у односу на нетрансформисане ћелије, које ћелије имунског система такође препознају (150). Ефекторски механизми ћелија урођеног и стеченог имунитета играју важну улогу у препознавању и елиминацији туморских ћелија (151, 152), Успешност одређеног хемотерапеутика не мери се само његовом ефикасношћу против ћелија тумора већ и способношћу да стимулише имунски одговор организма против карцинома (153).

Тумор-асоцирани макрофаги TAMs (*Tumor-associated macrophages*), су фагоцити који спадају у ћелије урођеног имунитета, али учествују и у ефекторским механизмима стечене имуности (154). М1 макрофаги су класично активирани макрофаги који ослобађају прозапаљенске цитокине и убијају туморске ћелије активацијом антитуморског имунског одговора (155). Алтернативно активирани макрофаги су М2 макрофаги имају улогу у уклањању мртвих ћелија, индукцији ангиогенезе и репарацији оштећеног ткива (156) Функција М1 макрофага може бити инхибирана функцијом М2 макрофага (157, 158).

НК ћелије (*Natural Killer cells*) су део урођеног имунитета али и луче цитокине који покрећу стечени имунски одговор (159). НК ћелије се активирају у контакту са малигно трансформисаним ћелијама и брзо их лизирају (160, 161). Ове ћелије имају значајну улогу у заустављању раста тумора и елиминацији метастаза (162). Измењене лиганде на ћелијама тумора препознају активациони рецептори НК ћелија (NKp30, NKG2D, NKp46), док инхибициони рецептори препознају МНС молекуле главног комплекса ткивне подударности I класе које експримирају скоро све нормалне ћелије (163, 164). Након активације НК ћелије индукују апоптозу зависну од перфорина и гранзима В. (165). Индукција перфорин независне апоптозе уз помоћ лиганда смрти такође може бити посредована НК ћелијама (166). Лиганд смрти FasL се везују за рецептор смрти Fas и активира FADD адаптерске протеине, који преко иницијаторске каспазе 8, а затим ефекторске каспазе 3, циљану ћелију уводе у апоптозу (167) На површини НК ћелија експримирају се *toll-like* рецептори који имају улогу сензора за оштећене ћелије DAMPs (*Damage-AssociatedMolecularPattern*) у микросредини тумора (168).

Антиканцерогена активност НК ћелија може бити супримирана и локално и системски, јер на њу утичу физичке карактеристике, као и хемијски и биолошки фактори.

Значајна је улога НКТ ћелија (*Natural Killer T cells*) и у урођеном и у стеченом имунитету (169). Оне продукују IFN- γ , имунорегулаторни цитокин, који стимулише фагоцитозу, активира НК ћелије и стимулише CD8+Т лимфоците (170). Ослобађање цитокина повећава цитотоксичну активност НКТ ћелија, доводи до снажног антитуморског одговора и прекида имunosупресије (171). НКТ ћелије могу попут НК ћелија да директно да убију циљану ћелију индукцијом апоптозе зависне од перфорина (172). До активације НКТ ћелија доводе и екзогени гликолипиди који могу супримирају раст тумора као што је меланом, карцинома плућа, дојке и колоне (173, 174).

Цитотоксични CD8+Т лимфоцити након активације индукују апоптозу зависну од перфорина и гранзима али и перфорин независну апоптозу помоћу лиганда смрти (175). Регулаторни Т лимфоцити олакшавају ћелијама тумора да избегну антитуморски одговор тако што инхибирају сазревање антигенпредентујућих ћелија и стимулишу излучивање инхибиторних супстанци (176, 177). Регулаторни Т лимфоцити утичу на смањење цитотоксичне активности НК ћелија, као и НКТ ћелија (178, 179). Помагачки

CD4+T лимфоцити делују тако што активирају CD8+T лимфоците продукујући различите цитокине којима обављају разне ефекторске функције. Уколико туморске ћелије престану да продукују туморске антигене или услед мутације гена престану да испољавају МНС молекуле I класе, T ћелије могу да не препознају тумор. До инхибиције активације T ћелија долази услед продукције имуносупресивних цитокина или лиганда за инхибиторне рецепторе на T ћелијама, као што је PD-L1. Такође, инхибиција активације или диференцијације T ћелија у Th1 и цитотоксичне CD8+ T лимфоците настаје услед особине тумора да стварају имуносупресивну микросредину (180, 181).

Ефикасност лекова за лечење карцинома зависи од њиховог различитог одговора на оштећења ДНК малигно трансформисаних и здравих ћелија (182). Одређивање оптималног хемотерапеутског протокола за одређени тип карцинома представља сложен процес који захтева индивидуалан приступ. Туморска имунологија је усмерена на класификацију туморских антигена, разумевања природе имунског одговора организма на туморе и механизма којима тумори избегавају тај одговор (180).

1.3. КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ

Малигни тумори дебелог црева настају акумулацијом генетских и епигенетских промена, које за резултат имају трансформацију ћелија дебелог црева у карцином. Већина карцинома колоне настаје трансформацијом примарног тумора аденома услед геномске нестабилности, која обично траје и до петнаест година (183).

Фактори који утичу на појаву карцинома дебелог црева су генска предиспозиција и фактори животне средине, при чему је старење највећи фактор ризика за појаву спорадичних случајева карцинома дебелог црева. Преко 90% спорадичних случајева карцинома колоне се појављује код особа старијих од 50 година. Непромењиви фактори ризика укључују и расну и етничку припадност, присуство карцинома дебелог црева у породичној анамнези, као и присуство полипа и инфламаторних болести црева у личној анамнези, док исхрана сиромашна влакнима и фолатима а богата мастима, алкохол, пушење, гојазност и недовољна физичка активност спадају у факторе ризика на које може да се утиче (184). Око 5% свих карцинома колоне настаје услед наследних генетских мутација. Код наследних форми карцинома дебелог црева прва мутација погађа један од алела у герминативној ћелији док се други мутациони догађај јавља у соматској ћелији. Од преосталих 95% случајева, око 20% случајева имају позитивну породичну анамнезу, али се не могу сврстати ни у једну категорију наследних облика карцинома дебелог црева (185, 186).

1.3.1. Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома

Колоректални карцином (CRC *colorectal cancer*), са 1,93 милиона процењених случајева и више од 950.000 смртних исхода у 2020. години био је трећи најчешће дијагностиковани карцином на светском нивоу. Овај карцином је трећи по учесталости у мушкој популацији, док је други у женској популацији, са процењених више од милион нових случајева и више од 500.000 смртних исхода код мушкараца и са процењених више од 860.000 нових случајева и више од 410.000 смртних исхода код жена, у 2020. години (187). Процена је да би број новодијагностикованих пацијената од карцинома ректума и колоректума до 2030. године могао достићи број од 2,2 милиона а очекује се да тада већ буде 1,1 милион смртних исхода на годишњем нивоу (188) (4).

Више од три четвртине свих случајева и око 70% свих смртних исхода од колоректалног карцинома примећено је у земљама са високим степеном економског развоја. Трендови стабилизације се могу уочити у високо развијеним земљама, али у многим земљама са средњом и ниском стопом бруто друштвеног производа стопе учесталости и морталитета убрзано расту (189).

У Србији, као земљи у транзицији, овај тренд је такође присутан. У нашој популацији 2020. године забележено 5.989 новооболелих од колоректалног карцинома, док је број умрлих процењен на 3.312. Овај карцином је у нашој земљи трећи по учесталости у женској популацији, са 2.204 нових случајева, док је други у мушкој популацији, са забележених 3.785 нових случајева, у 2020. години (189).

Малигни тумори чинили су преко две трећине свих узрока смрти током 2021. године у Србији, а скоро свака седма умрла особа (14,6%) била је жртва малигног тумора. Према подацима регистра за карцином, мушкарци су највише оболевали и умирали од карцинома бронха и плућа, дебелог црева и ректума и карцинома простате. Код жена малигни тумор је најчешће био локализован на дојци, бронху и плућима и у дебелом цреву и ректуму. Истовремено, жене су најчешће биле жртве карцинома дојке, бронха и плућа, и карцинома дебелог црева и ректума (190).

Напори да се изгради одржива инфраструктура за ширење мера за превенцију рака и пружање адекватне неге пацијентима оболелим од карцинома у земљама у транзицији су од кључне важности за контролу карцинома на глобалном нивоу (187).

1.3.2. Новине у терапији колоректалног карцинома

Локализација и величина тумора два су најважнија чиниоца од којих зависи клиничка слика болести. Постоје разлике у клиничкој слици тумора смештених у левој и десној половини дебелог црева. Развојем болести јављају се друга метастатска жаришта у јетри, лимфним чворовима и плућима. Иако се примењују најновије хистопатолошке методе, савремене хируршке технике, као и биолошка иновативна хемотерапија, код више од половине пацијената болест се поново јавља (191). Петогодишње преживљавање пацијената у почетном стадијуму карцинома колоне и ректума, према подацима из литературе, износи приближно 90%. Међутим, преживљавање је знатно мање и износи 10% код пацијената који имају већ присутне удаљене метастазе у тренутку када је болест откривена (192, 193).

Одређивање клиничког стадијума болести стандардни је поступак код онколошких болесника. Прва подела колоректалног карцинома на основу тих налаза, потиче из 1932. године и приписује се америчком патологу Дукесу (*Cuthbert Dukes*). По тој класификацији се тумори дебелог црева деле се у следеће групе:

- А – раст карцинома је ограничен на мукозу и субмукозу црева, без метастаза у лимфне чворове;
- В – карцином захвата цео зид црева, без захватања регионалних лимфних чворова,
- С – карцином захвата зид дебелог црева до различите дубине, али су присутне метастазе у регионалним лимфним чворовима,
- D – присутне су удаљене метастазе или локално иноперабилан тумор (194, 195).

Патохистолошка класификација Светске здравствене организације за одређивање стадијум аумора је ТНМ (тумор, нод, метастаза) класификација, а за одређивање резидуалног статуса тумора R (residual) класификација (196). Данас се

најчешће користи *UICC/AJCC (International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer)* ТНМ класификација (197).

Лечење карцинома колоне и ректума је мултидисциплинарно и у већини случајева примењују се два или три облика лечења. Хируршко лечење може бити радикално или парцијално. Одговарајућа адјувантна хемотерапија и зрачење могу повећати изгледе за преживљењем. Успех лечења зависи од стадијума болести, тако да Дукес А има 90% излечење, Дукес В има 60-80% док Дукес С има излечење 35-50% (198).

Стандардна хемотерапија код карцинома дебелог црева укључује примену класичних цитостатика као што је 5-флуороурацил у комбинацији са оксалиплатином и иринотеканом. Последњих година све су интензивнија испитивања циљане терапије која специфично погађа одређене сигналне путеве ћелија канцера. Међутим, лечење класичним хемотерапеутицима, као и промена циљане терапије је често отежана због развоја резистенције (199).

Цитотоксични лекови за прву линију су флуоропиримидини (5-флуороурацил са леуковорином, орална терапија прекурсором капецитабином), оксалиплатин и иринотекан.

Ови лекови се најчешће примењују кроз протокол **FOLFOX** (оксалиплатин, леуковорин, 5-флуороурацил) или **FOLFIRI** (иринотекан, леуковорин, 5-флуороурацил) а изузетно као триплет **FOLFOXIRI** (оксалиплатин, иринотекан, леуковорин, 5-флуороурацил) (200). Клиничка примена оксалиплатина, према подацима из литературе, повећала је преживљавање пацијената од карцинома дебелог црева који се налази у поодмаклом стадијуму. Али код скоро 40% оболелих у овом стадијуму ипак долази до развоја резистенције на терапију (201, 202)

Уколико се примењује биолошка терапија, моноклонско антитело бевацизумаб се увек комбинује са флуоропиримидинима а у протоколима се додаје и оксалиплатин или иринотекан. Антитела цетуксимаб или панитумумаб комбинују само са **FOLFIRI** или **FOLFOX** режимима (203). За пацијенте код којих је могуће постићи смањење метастаза у јетри и где би требало применити врло активну прву линију лечења. Предлог је комбинација три лека, два класична цитостатика са моноклонским антителом или, изузетно, три хемотерапеутика. За пацијенте код којих примарни циљ спречити даљу прогресију болести као терапија се препоручује 5-флуороурацил или комбинација са бевацизумабом.

Смернице ESMO (*European Society of Medical Oncology*) као стандардни протокол у лечењу Дукес С стадијума карцинома колоне предлажу комбинацију коју чине оксалиплатин и 5-флуороурацил или леуковорин. Оксалиплатин у комбинацији са 5-флуороурацилом се показао супериорнијом терапијом од монотерапије 5-флуороурацилом, када се посматра укупно преживљавање оболелих и преживљавање без знакова болести (204). Код пацијената са Дукес А стадијумом болести петогодишње преживљење је 80 до 90% након радикалне хирургије, код Дукес В је петогодишње преживљење 60 до 80% након адјувантне хеморадиотерапије, а код Дукес С је 35 до 50%.

1.3.2.1. Адјувантна хемотерапија и радиотерапија карцинома дебелог црева и ректума

Након примарног хируршког одстрањивања карцинома колоректума започиње се са применом адјувантне хемотерапије. Циљ је уклањање свих преосталих ћелија карцинома како би се смањила вероватноћа од поновне појаве тумора. Оптимално

време за започињање терапије је од треће недеље, а најкасније 8-12 недеља након хируршке интервенције (205, 206).

Ова терапија се примењује код свих пацијената у Дукес С стадијуму болести као и у Дукес В стадијуму код високоризичних пацијената (207). Пацијентима у Дукес С стадијуму болести требало би укључити адјувантну хемотерапију која обухвата 5-FU и оксалиплатину као **FOLFOX** инфузиони протокол или орални **XELOX** протокол (капецитабин и оксалиплатин), у комбинацији с претходном болусном применом **FLOX** протокола (5-FU, леуковорин, оксалиплатин или капецитабин) (208). Администрација лекова би требало да траје најмање шест месеци. Адјувантна хемотерапија код Дукес С облика карцинома смањује појаву метастаза код 20-30% лечених пацијената. Адјувантна хемотерапија за ризичне пацијенте у Дукес В стадијуму обухвата комбинацију 5-FU и леуковорина или капецитабина, са или без оксалиплатине.

Радиотерапија представља веома битан облик лечења код болесника с карциномом колоне. Посебно је корисна адјувантна примена зрачења са хемотерапијом. Адјувантна хеморадиотерапија примењује се код пацијената након радикалног хируршког лечења стадијума болести Дукес В и Дукес С, јер је код њих ризик за појаву рецидива чак 50% (209). Зрачење се може применити и преоперативно и постоперативно, што је тренутно чешћи случај.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је био утврдити потенцијални анитуморски ефекат динуклеарних комплекса платине(II) *in vitro* коришћењем СТ26 ћелијске линије миша и *in vivo* у експерименталном моделу карцинома колона, јер је било очекивано да ће испитивани комплекси показати израженији анитуморски ефекат у експерименталном моделу карцинома колона миша, када се као стандард користи оксалиплатина, као и цисплатина.

Одређени су и урађени су следећи експериментални задаци:

1. Синтетисани су одговарајући платина(II) комплексе типа $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\text{X})\}\text{Cl}_2$ (L је бидентатно координовани диамински лиганд).
2. Структура новонасталих комплекса и њихових лиганада предвиђена је елементалном микроанализом, инфрацрвеном, ултраљубичастом и нуклеарно-магнетно-резонантном спектроскопијом (^1H и ^{13}C NMR).
3. Испитана је цитотоксичност динуклеарних комплекса платине(II) на СТ26 ћелијској линији *in vitro*.
4. Испитан је утицај динуклеарних комплекса платине(II) на ћелијски циклус СТ26 ћелијске линије *in vitro*.
5. Испитано је анитуморско деловање динуклеарних комплекса платине(II) *in vivo* на анималном моделу тумора колона миша изазваном субкутаном применом СТ26 ћелија.
6. Испитане су евентуалне нежељене токсичне ефекте (токсичност на јетру, плућа и мозак) динуклеарних комплекса платине(II).

2.2. РАДНА ХИПОТЕЗА ИСПИТИВАЊА

Динуклеарни комплекси платине(II) у раствору постоје у катјонском облику и њихова растворљивост у води је већа у односу на неутралне комплексе, услед чега имају израженију способност интеракције са протеинима у ћелији. Очекивано је да ће испитивани комплекси показати антитуморски ефекат који је израженија СТ26 ћелијама и у експерименталном моделу карцинома колона миша, када се као стандард користи оксалиплатина, као и цисплатина.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ХЕМИКАЛИЈЕ И РЕАГЕНСИ

У првој фази извршићемо деминерализацију дестиловане воде и пречистити је до отпора не већег од $10 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$. Супстанце калијум тетрахлоороплатинат $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$, пиразин или 1,4-диазин (pz), пиридазин или 1,2-диазин (pydz), (\pm)-1,3-пентандиамин (1,3-pnd), 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин (2,2-diMe-1,3-pd), 1,3-пропилендиамин (1,3-pd), *trans*- (\pm) -1,2-диаминоциклохексан (dach), изобутилендиамин (ibn), (\pm) -1,2-пропилендиамин (1,2-pn) и етилендиамин (en) су добијене од произвођача Sigma-Aldrich. На собној температури су извршена сва рН мерења. рН-метар је калибрисан (S220 SevenCompact, рН/Ion, MettlerToledo) пуферским растворима од рН 4,00 и рН 7,00. ^1H и ^{13}C NMR спектри су снимљени на спектрометру VarianGemini 2000 (^1H на 200 MHz, ^{13}C на 50 MHz) коришћењем 5 mm NMR кивета. NMR узорци су припремљени у D_2O (деутеријум оксид) као растварачу, а укупна запремина раствора је била 0,6 mL. Натријум триметилсилилпропан-3-сулфонат (TSP) је коришћен као интерни стандард. Елементална микроанализа за параметре угљеника, водоника и азота изведена стандардним техникама у Микроаналитичкој лабораторији Универзитета у Београду - Хемијског факултета.

3.2. СИНТЕЗА ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II)

3.2.1. Синтеза полазних мононуклеарних комплекса $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$

Комплекси платине(II) опште формуле $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ (L је координовани амински или диамински лиганд) су синтетисани модификованим поступком који је раније описан у литератури (13). Чистоћа и састав комплекса су проверени елементарном микроанализом, инфрацрвеном (IR) и нуклеарно-магнетно-резонантном (^1H и ^{13}C NMR) спектроскопијом.

У води запремине 10 cm^3 растворено је 0,2076 g ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mola) $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ и додат је одговарајући диамински лиганд L, у еквимоларној количини. Додат је раствор HCl концентрације $1,0 \text{ mol/dm}^3$ до постизања рН = 3,0. Реакциона смеша је загревана на температури од $80 \text{ }^\circ\text{C}$, укупно 2 часа. На собној температури су сви комплекси кристалисали. Издвојени комплекси кристала одвојени су цеђењем, испрани малом количином хладне воде, испрани етанолом и осушени на ваздуху. Пречишћени комплекси су добијени кристализацијом тако што је преостала запремина воде накнадно охлађена.

3.2.2. Синтеза $\{[Pt(L)Cl]_2(X)\}Cl_2$ динуклеарних комплекса

Комплекси типа $[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2$ (L је различити кординовани амински/диамински лиганд, а X је мостни лиганд пиразин (pz) или пиридазин (pydz)) су добијени од одговарајућих мононуклеарних комплекса типа $[Pt(L)Cl_2]$ модификованим поступком који је раније описан у литератури (6,7).

Мононуклеарни комплекси $[Pt(L)(dmf)Cl]NO_3$ (dmf - диметилформаид), добијени су додатком одговарајућег хлоридо комплекса ($[Pt(L)Cl_2]$) у $AgNO_3$ у молском односу 1:0,98, у диметилформаиду као растварачу.

У 5 cm^3 диметилформаида растворено је $0,0553\text{ g}$ ($3,25 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$) $AgNO_3$. У овако добијени раствор додата је суспензија комплекса $[Pt(L)Cl_2]$ ($3,32 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$) у 10 cm^3 диметилформаида. Реакциона смеша је увијена у алуминујумску фолију и остављена преко ноћи на собној температури, уз повремено мешање. Настали талог $AgCl$ је одвојен цеђењем, а бледо жути раствор $[Pt(L)(dmf)Cl]^+$ комплекса у диметилформаиду коришћен је као полазна супстанца за синтезу одговарајућих динуклеарних $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}Cl_2$ комплекса.

У раствор који садржи комплекс $[Pt(L)(dmf)Cl]^+$ лагано је укапаван раствор који је добијен растварањем $1,69 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$ пиразина (pz), односно пиридазина (pydz) у 5 cm^3 диметилформаида. Реакциона смеша је увијена у алуминујумску фолију и остављена уз мешање на собној температури око 12 h. На ротационом вакуум упаривачу упарен је диметилформаид, а суви остатак испран неколико пута етром. Након испаравања етра, суви остатак је растворен у што мањој запремини $LiCl$ концентрације $0,5\text{ mol/dm}^3$. Добијени раствор остављен је у фрижидеру преко ноћи. Добијени комплекси $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}Cl_2$ су одвојени цеђењем, испрани метанолом, затим етром и сушени на ваздуху.

3.3. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II)

Састав синтетисаних комплекса платине(II), као и њихова чистоћа, проверени су на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене (IR), ултраљубичасте (UV-Vis) и нуклеарно-магнетно-резонантне (1H и ^{13}C NMR) спектроскопије. Код снимања 1H и ^{13}C NMR спектра $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}Cl_2$ комплекса коришћен је D_2O као растварач.

3.3.1. Елементална микроанализа

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

3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра је урађено на Институту за хемију Природно-Математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на спектрофотометру Perkin-Elmer FTIR 31725X.

3.3.3. UV-Vis спектрофотометрија

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

3.3.4. Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија

Нуклеарно-магнетно-резонантни спектри комплекса су снимљени на Природно-математичком факултету, Универзитет у Крагујевцу, на *Varian Gemini-2000 NMR* спектрофотометру. Као растварачи коришћени су D₂O и (CD₃)₂SO (DMSO-*d*₆) и референтни стандард TSP (натријум-3 (триметилсилил) -пропионат-2,2,3,3-*d*₄).

3.4. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА *in vitro*

Пошто овај докторат представља експерименталну студију на материјалу анималног порекла *in vitro*, цитотоксична, митотска и пролиферативна активност испитивана је на СТ26 (ATCC[®] CRL-2638[™]) ћелијској линији карцинома колона миша МТТ тестом, анализом ћелија обојених Annexin-ом V и пропиридијум-јодидом, анти-Ki67 антителом и анализом ћелијског циклуса.

3.4.1. Ћелијске културе

За испитивање *in vitro* ефеката динуклеарних комплекса платине(II) коришћена је СТ26 (ATCC[®] CRL-2638[™]) ћелијска линија, гајена у DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagle Medium) са 2 mM L-глутамин, 10% феталног говеђег серума, 10000 Iu/ml пеницилина и 10 mg/ml стрептомицина, произвођача Sigma Aldrich, Немачка. Ћелије су култивисане на 37°C, у апсолутној влажности и атмосфери која садржи 5% угљен-диоксида.

За *in vitro* испитивања су коришћене и ћелијска линија лимфома миша 2PK3 (ATCC[®] TIB-203[™]), хроничне лимфоцитне леукемије миша BCL1 (ATCC[®] TIB-197[™]) и карцинома дојке миша 4T1 (ATCC[®] CRL-2539[™]).

In vitro истраживања спроведена су у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.4.2. Припрема раствора комплекса

Основни раствор комплекса платине(II) за *in vitro* тестове добијен је растварањем одговарајућих комплекса у стерилном физиолошком раствору у концентрацији од 20 mM и разблажен хранљивим ћелијским медијумом, DMEM, произвођача Sigma Aldrich, Немачка, до различитих радних концентрација. Сви раствори су припремљени на дан третмана ћелија. Као контролне супстанце коришћене су цисплатин и оксалиплатин, произвођача Sigma Aldrich, Немачка.

3.4.3. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест за испитивање цитотоксичног деловања

СТ26 ћелије ($5 \cdot 10^4$ ћелија/ml) су излагане испитиваним комплексима у различитим концентрацијама и различитим временским интервалима. Затим су излагане 15% МТТ раствору 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-диметилтетразолиум-бромида четири часа у микротитар плочама које имају 96 отвора. Након инкубације медијум је одливен, и у сваки отвор, где се налазио формиран продукт, сипано је 150 μ L диметил-сулфооксида (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 μ L глицинског пуфера (pH-10,5). Интензитет боје накупљене у ћелијама је колориметријски одређен на таласној дужини од 570 nm. Ако упоредимо интензитет боје коју дају ћелије излагане чистом медијуму и интензитет боје коју дају ћелије излагане испитиваном комплексу, одређујемо ефекат испитиваног комплекса.

3.4.4. Квантитативно испитивање апоптотске смрти AnnexinV-FITC тестом

Третиране ћелије бојених Annexin-om V и пропидијум-јодидом (PI) су анализиране проточном цитометријом. Ћелије у експоненцијалној фази раста су поново засејане на 9 нових фласкова. Медијум је замењен другим, са додатком испитиваног комплекса у одговарајућој концентрацији, у тренутку када су ћелије прекриле 70% дна флашка. Контролним ћелијама су додати комплекси, а медијум замењен свежим. Ћелије су покупљене из фласкова након 24 часа, душло опране комплетним медијумом и поново растворене у пуферу како би могле да вежу Annexin V (10X пуфер: 25 mM CaCl₂; 1,4 M NaCl; 0,1 M HEPES, pH 7,4), достужући густину од милион ћелија по mL. По 5 μ L Annexin-a V (BD Pharmingen, САД) и 5 μ L PI (50 μ g/ml PBS-a) (Sigma Aldrich, Немачка) додато је у 100 μ L те суспензије. Додато је по 400 μ L 10 \times пуфера за везивање након 15 минута инкубације на собној температури и заштићено од светлости. 20000 догађаја је анализирано на FACSCalibur BD проточном цитометру. Сви подаци су обрађени у програму Winmdi 2.9.

3.4.5. Процена пролиферативне способности мерењем експресије Ki-67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом

После двадесетчетворочасовног излагања **Pt1-Pt9** комплексима или оксалиплатини (IC50 концентрације), CT26 ћелије су фиксиране, пермеабелизоване пуфером (BD Bioscience) и инкубиране Ki67 специфичним антителом коњугованим флуоресцеин изотиоцијанатом (Bioegoscience, SAD), или FITC-коњугованим контролним изотипом антитела (Bioscience, San Diego, SAD), у трајању од 30 минута. Проточна цитометрија је спроведена на FACSCalibur-овом проточном цитометру (BD Biosciences, SAD). Резултати су обрађени коришћењем програма FlowJo (Tree Star).

3.4.6. Анализа ћелијског циклуса

Да би се испитали потенцијални ефекти комплекса **Pt1-Pt9** на поремећаје ћелијског циклуса CT26 ћелија, ћелије су третиране одговарајућим IC50 концентрацијама комплекса платине(II) и оксалиплатина или само медијумом (контрола) током 24 часа на 37 °C, у атмосфери која садржи 5% CO₂ и при апсолутној влажности. Анализа ћелијског циклуса је изведена бојом Vibrant[®] DieCicle[™] Rubi (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA) према упутствима произвођача. CT26 ћелије обојене Vibrant DieCicle Rubi-ом анализирани су коришћењем проточног цитометра FACS Caliburza сортирањем ћелија методом флуоресценције (BD Biosciences, San Jose, SAD). Дистрибуција ћелијског циклуса је анализирана коришћењем софтвера FlowJo (Tree Star).

3.5. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ *in vivo*

КОМПЛЕКСА

Пошто овај докторат представља и експерименталну студију на животињама *in vivo*, коришћен је примарни хетеротопски модел тумора колона миша изазван субкутаном применом СТ26 ћелија у дорзо лумбалну регију BALB/с мишева.

3.5.1. Експерименталне животиње

Као експерименталне животиње коришћени су мишеви соја BALB/с мушког пола, старости од 8 до 12 недеља. Мишеви су чувани у околини са контролисаном температуром (22–24 °C) са циклусом светло-мрак од 12 сати и давана им је стандардна лабораторијска храна и вода *ad libitum*. Сви експерименти су одобрени и спроведени према Смерницама Етичког одбора за животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (одобрење бр. 01-5900 од 10. 5. 2017. године). Експерименталне животиње су подељене у 8 група.

In vivo истраживања спроведена су у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.5.2. Експериментални модел карцинома дебелог црева

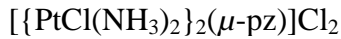
У прве четири групе тумор је се индукован субкутаном применом (у леву дорзолумбалну регију) 1×10^6 СТ26 ћелија суспендованих у 50 μL DMEM-а, сингених за BALB/с мишеве. Раст палпабилног примарног тумора праћен је сваког дана, уз истовремено морфометријско одређивање његове запремине. Запремина тумора је израчуната по формули $V (\text{mm}^3) = L (\text{највећи промер}) \times W^2 (\text{најмањи промер}^2) / 2$.

Када је осмог дана након инокулације примарни тумор постао палпабилан, експерименталне животиње су почеле да добијају испитиване комплексе интраперитонеално, три пута недељно, у току три недеље, и то:

1. група - оксалиплатин,
2. група - μ -пиразин-бис(диаминхлоридоплатина(II))-хлорид, $[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$,
3. група - μ -пиразин-бис(етилендиаминхлоридоплатина(II))-хлорид, $[\{\text{PtCl}(\text{en})\}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$,
4. група - физиолошки раствор.

Интравенски су и групе мишева код којих није индукован тумор добијале су испитиване комплексе и то:

5. група- оксалиплатин,
6. група - μ -пиразин-бис(диаминхлоридоплатина(II))-хлорид,



7. група - μ -пиразин-бис(етилендиаминхлоридоплатина(II))-хлорид,
 $[{\text{PtCl}(\text{en})}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2$

8. група - нетретиране животиње.

Сваки лек је апликован у концентрацији 5 mg/kg, растворен у 200 μL физиолошког раствора, подељено у осам доза, три пута недељно. Концентрације комплекса који су се користили за *in vivo* примену израчунати су на основу *in vitro* испитивања цитотоксичности на СТ26 ћелијској линији. Праћено је преживљавање по групама, а антитуморски ефекти су одређени поређењем величине тумора у третираним и животињама које су уместо комплекса примале физиолошки раствор.

3.5.3. Процена раста хетеротопског карцинома дебелог црева

Величина примарног СТ26 тумора дебелог црева је процењена морфометријски коришћењем кљунастог, помичног мерила са нониусом. Запремина тумора је израчуната на следећи начин:

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

Процент инхибиције раста тумора (TGI) је одређен према формули $\text{TGI}(\%) = (V_c - V_t) / (V_c - V_0) \times 100$, где су V_c и V_t медијане контролне и третиране групе, респективно, мерене на крају студија, а V_0 на почетку. Резултати су изражени као средња вредност запремине тумора \pm стандардна девијација (SD).

3.5.4. Хистопатолошка анализа метастаза

У циљу испитивања ефекта комплекса на развој метастаза, 21. дана од почетка примене комплекса, мишеви су жртвовани цервикалном дислокацијом, након чега им је извађена крв из абдоминалне аорте и изоловани су плућа, јетра и мозак. Метастатске промене нису верификоване у мозгу жртвованих мишева. Направљени су парафински препарати од ткива плућа и јетре, обојени еозин-хематоксилинским бојењем (по Heidenhain-у и по препорукама Gurr-a). Анализирано је 5 пресека ткива по мишу. Коришћени су пресеци ткива са пет нивоа на растојању од 25 μm . Метастазе су верификоване у плућима и јетри под светлосним микроскопом (BX51, Olympus, Japan).

3.5.5. Испитивање токсичности комплекса

Одређени су серумски нивои уреје и креатинина ради процене функције бубрега, и ензима јетре, аспартат аминотрансферазе (AST) и аланин аминотрансферазе (ALT),

који су показатељ евентуалне хепатотоксичности. Концентрација трансаминаза је мерена коришћењем мишјег AST ELISA кита и мишјег ALT ELISA кита (Elabscience).

3.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка анализа експерименталних података укључила је средњу вредност и стандардну девијацију (SD) као основне дескриптивне статистике. За тестирање нормалности параметара дистрибуције коришћен је *Kolmogorov-Smirnov* тест. Статистичка значајност је одређена Студентовим t тестом (параметарски тест) за узорке који имају нормалну расподелу и *Mann-Whitney* и *Kruskal-Wallis* тестом за узорке који немају нормалну расподелу. Статистичка значајност је претпостављена за $p = 0,05$. За статистичку обраду добијених резултата коришћен је IBM програмски пакет SPSS верзија 20 (SPSS Inc., IL, SAD).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. СИНТЕЗА ПОЛАЗНИХ МОНОНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА $[Pt(L)Cl_2]$

Комплекси платине(II) типа $[Pt(L)Cl_2]$ (L је координовани амински/диамински лиганд) су синтетисани модификованим поступком који је раније описан у литератури (13).

У води запремине 10 cm^3 растворено је $0,2076\text{ g}$ ($5,0 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$) $K_2[PtCl_4]$ и додат је одговарајући диамински лиганд L, у еквимоларној количини. Додат је раствор HCl концентрације $1,0\text{ mol/dm}^3$ до постизања $pH = 3,0$. Реакциона смеша је загревана на температури од $80\text{ }^\circ\text{C}$, укупно 2 часа. На собној температури су сви комплекси кристалисали. Издвојени комплекси кристала одвојени су цеђењем, испрани малом количином хладне воде, испрани етанолом и осушени на ваздуху. Пречишћени комплекси су добијени кристализацијом тако што је преостала запремина воде накнадно охлађена.

4.2. СИНТЕЗА ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА $\{[Pt(L)Cl_2(X)]\}_2Cl_2$

Комплекси типа $\{[Pt(L)Cl_2(\mu\text{-pz})]\}_2Cl_2$ (L су различити координовани амински/диамински лиганди, а X је мостни лиганд пиразин (pz) или пиридазин (pydz) су добијени од одговарајућих мононуклеарних комплекса типа $[Pt(L)Cl_2]$ модификованим поступком који је раније описан у литератури (6,7).

Мононуклеарни комплекси типа $[Pt(L)(dmf)Cl]NO_3$ (dmf је диметилформаид), добијени су додатком одговарајућег хлоридо комплекса ($[Pt(L)Cl_2]$) у $AgNO_3$ у молском односу 1:0,98, у диметилформаиду као растварачу.

У 5 cm^3 диметилформаида растворено је $0,0553\text{ g}$ ($3,25 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$) $AgNO_3$. У овако добијени раствор додата је суспензију комплекса $[Pt(L)Cl_2]$ ($3,32 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$) у 10 cm^3 диметилформаида. Реакциона смеша је увијена у алуминујумску фолију и остављена преко ноћи на собној температури, уз повремено мешање. Настали талог $AgCl$ одвојен је цеђењем, а бледо жути раствор комплекса $[Pt(L)(dmf)Cl]^+$ у диметилформаиду је коришћен као полазна супстанца за синтезу одговарајућих динуклеарних комплекса $\{[Pt(L)Cl_2(\mu\text{-X})]\}_2Cl_2$.

У раствор који садржи комплекс $[Pt(L)(dmf)Cl]^+$ лагано је укапаван раствор који је добијен растварањем $1,69 \cdot 10^{-4}\text{ mola}$ пиразина (pz), односно пиридазина (pydz) у 5 cm^3 диметилформаида. Реакциона смеша увијена у алуминујумску фолију остављена је уз мешање на собној температури око 12 h. На ротационом вакуум упаривачу је испарен диметилформаид, а суви остатак испран неколико пута етром. Након испаравања етра, суви остатак је растворен у минималној запремини $0,5\text{ mol/dm}^3$ LiCl. Добијени раствор је остављену фрижидеру преко ноћи. Светло жути кристали комплекса $\{[Pt(L)Cl_2(\mu\text{-X})]\}_2Cl_2$ одвојени су цеђењем, испрани метанолом, затим етром и сушени на ваздуху. Принос је 30–40%.

4.3. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА СИНТЕТИСАНИХ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА Pt(II)

Чистоћа и састав комплекса су проверени елементарном микроанализом, инфрацрвеном (IR) и нуклеарно-магнетно-резонантном (^1H и ^{13}C NMR) спектроскопијом.

$\{\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_4\text{H}_{16}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (Pt1), (Mr = 680,18):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 7,06; H, 2,37; N, 12,36. Нађено: C, 7,15; H, 2,42; N, 12,29%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~3435-3150 (N–H вибрације); 1668, 1638 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 9,05 (s, 4H, pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 154 (pz).

$\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2](\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (Pt2), (Mr = 732,25):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 13,12; H, 2,75; N, 11,48. Нађено: C, 13,16; H, 2,98; N, 11,19%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~3440-3075 (N–H вибрације); 1608, 1578 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm) : 2,74 (m, 8H, en), 9,03 ppm (s, 4H, pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm) : 52, 153.

$\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}_2](\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (Pt3), (Mr = 760,31):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 15,80; H, 3,18; N, 11,05. Нађено: C, 15,45; H, 3,19; N, 10,82%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~3435-3023 (N–H вибрације); 1598, 1567, 1437 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 1,34 (d, 6H, 1,2-pn), 2,72 (m, 4H, 1,2-pn), 3,22 (m, 2H, 1,2-pn), 9,01 (s, 4H, pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 18, 55, 60, 153.

$\{[\text{Pt}(\text{ibn})\text{Cl}_2](\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (Pt4), (Mr = 788,36):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 18,28; H, 3,58; N, 10,66. Нађено: C, 17,84; H, 3,63; N, 10,47%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): $\sim 3435\text{-}3041$ (N–H вибрације); 1599, 1435 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 1,45 (m, 12H, ibn), 2,66 (s, 4H, ibn), 9,13 (s, 4H, pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 26, 60, 64, 153.

$\{[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (Pt5), (Mr = 840,43):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 22,87; H, 3,84; N, 10,00. Нађено: C, 22,56; H, 3,94; N 9,56%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): $\sim 3435\text{-}3092$ (N–H вибрације); 1634, 1597, 1423 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 1,45 (m, 8H, dach), 1,92 (m, 8H, dach), 2,53 (m, 4H, dach), 9,00 (s, 4H, pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 27, 35, 64, 65, 153.

$\{[\text{Pt}(\text{1,3-pd})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 \cdot 2\text{LiCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_6\text{O}_2\text{Li}_2\text{Pt}_2$ (Pt6), (Mr = 881,12):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 13,63; H, 3,20; N, 9,54. Нађено: C, 13,80; H, 3,03; N, 10,07%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): $\sim 3435\text{-}3087$ (N–H вибрације); 1632, 1593, 1437 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 1,90 (m, 4H, 1,3-pd), 2,80 (m, 8H, 1,3-pd), 9,03 (s, 4H pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 30, 45, 46, 154.

$\{[\text{Pt}(\text{2,2-diMe-1,3-pd})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2 \cdot 2\text{LiCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{14}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{Cl}_6\text{O}_2\text{Li}_2\text{Pt}_2$ (Pt7), (Mr = 937,23):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 17,94; H, 3,87; N, 8,97. Нађено: C, 18,04; H, 3,72; N 9,17%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): $\sim 3435\text{-}3122$ (N–H вибрације); 1614, 1594, 1431 (C=N/C=N).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 1,00 (s, 12H, 2,2-diMe-1,3-pd), 2,38 (s, 4H, 2,2-diMe-1,3-pd), 2,49 (s, 4H, 2,2-diMe-1,3-pd), 9,05 (s, 4H pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 26, 36, 54, 55, 154.

$\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2 = \text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$ (Pt8), (Mr = 732,25):

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 13,12; H, 2,75; N, 11,48. Нађено: C, 13,16; H, 2,98; N, 11,19%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~3435- 3034 (N–H вибрације); 1627, 1582, 1441 (C=N/C=N)

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 2,80 (m, 8H, en), 8,14 (m, 2H, pydz), 9,58 (m, 2H, pydz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): = 51, 137, 164.

$[\{\text{Pt}, (1,3\text{-pnd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pz})](\text{ClO}_4)_2\text{H}_2\text{O} = \text{C}_{14}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{O}_9\text{Pt}_2$ (Pt9**), (Mr = 962,43) :**

Елементална микроанализа: Израчунато за C, 17,47; H, 3,56, N, 8,73. Нађено: C, 17,46; H, 3,48; N 8,58%.

IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~3435- 3121 (N–H вибрације); 1599, 1433 (C=N/C=N), 1090, 1070, 623 (контра јон перхлората).

^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 1,00 (m, 6H, 1,3-pnd), 1,85 (m, 8H, 1,3-pnd), 2,85 (m, 6H, 1,3-pnd), 9,05 (s, 4H, pz).

^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): = 12, 30,33, 34, 43, 44, 56, 57,154.

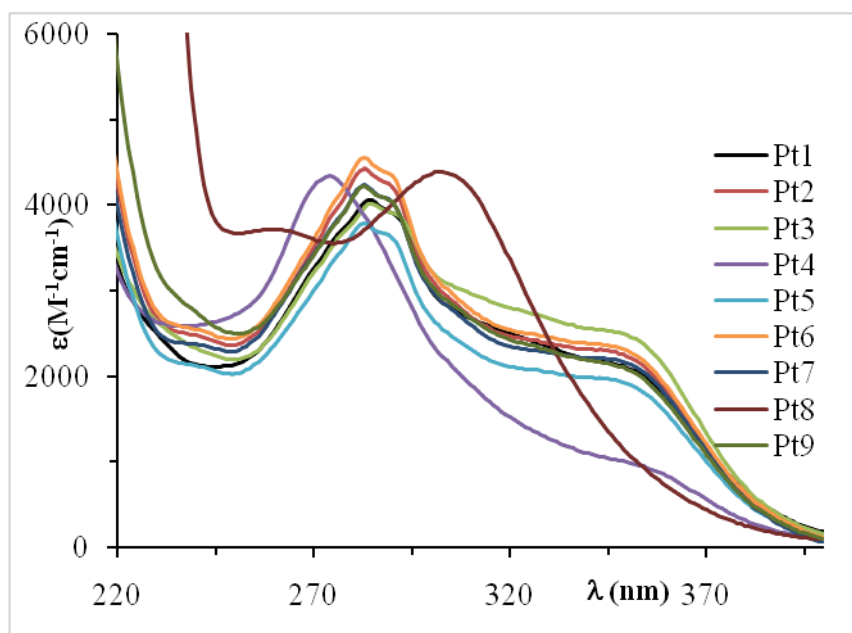
4.4. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА Pt1–Pt9 КОМПЛЕКСА НА ОСНОВУ IR СПЕКТРОСКОПИЈЕ

Инфрацрвени спектри су снимљени на Природно-Математичком факултету, Универзитет у Крагујевцу, Институт за хемију, на спектрофотометру Perkin-Elmer FTIR 31725X. За синтетисане комплексе **Pt1–Pt9** у чврстом стању IR спектри су снимани у опсегу од $4000\text{--}450\text{ cm}^{-1}$ и показују карактеристичне траке које одговарају координованом пиразинском или пиридазинском мостном лиганду, као и траке координованих аммина/диамина, амонијаку (NH_3), етилендиамину (en), (\pm) -1,2-пропилендиамину (1,2-pn), изобутилендиамину (ibn), *trans*- (\pm) -1,2-диаминоциклохексану (dach), 1,3-пропилендиамину (1,3-pd), 2,2-диметил-1,3-пропилендиамину (2,2-diMe-1,3-pd) и (\pm) -1,3-пентандиамину (1,3-pnd).

4.5. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА Pt1–Pt9 КОМПЛЕКСА НА ОСНОВУ UV СПЕКТРОСКОПИЈЕ

UV

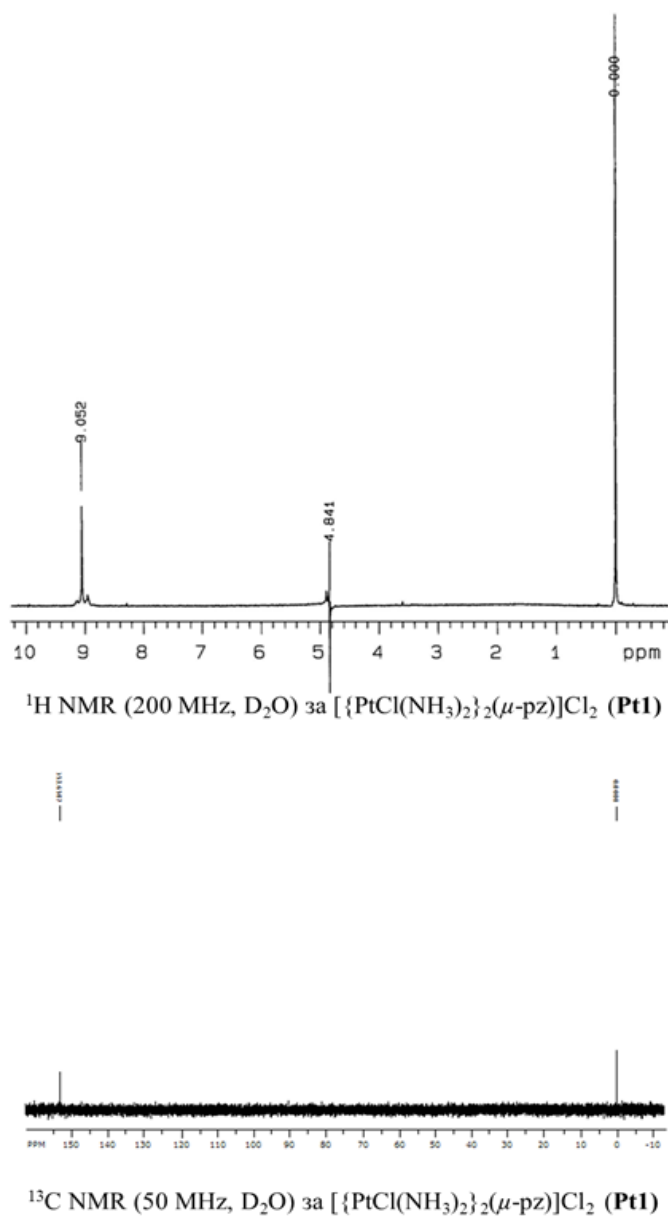
UV-Vis спектри (електронски апсорпциони спектри) су снимљени на Shimadzu double-beam спектрофотометру у опсегу таласних дужина 200 – 900 nm, опремљеном хелијом за термостатирање. Присутни карактеристични апсорпциони максимуми (λ max) у области 260 - 303 nm потичу од $\pi\text{--}\pi^*$ прелаза у одговарајућем *N*-хетероцикличном мостном лиганду. Спектри снимани у опсегу таласних дужина 200 – 900 nm и приказани су на **слици 8**.



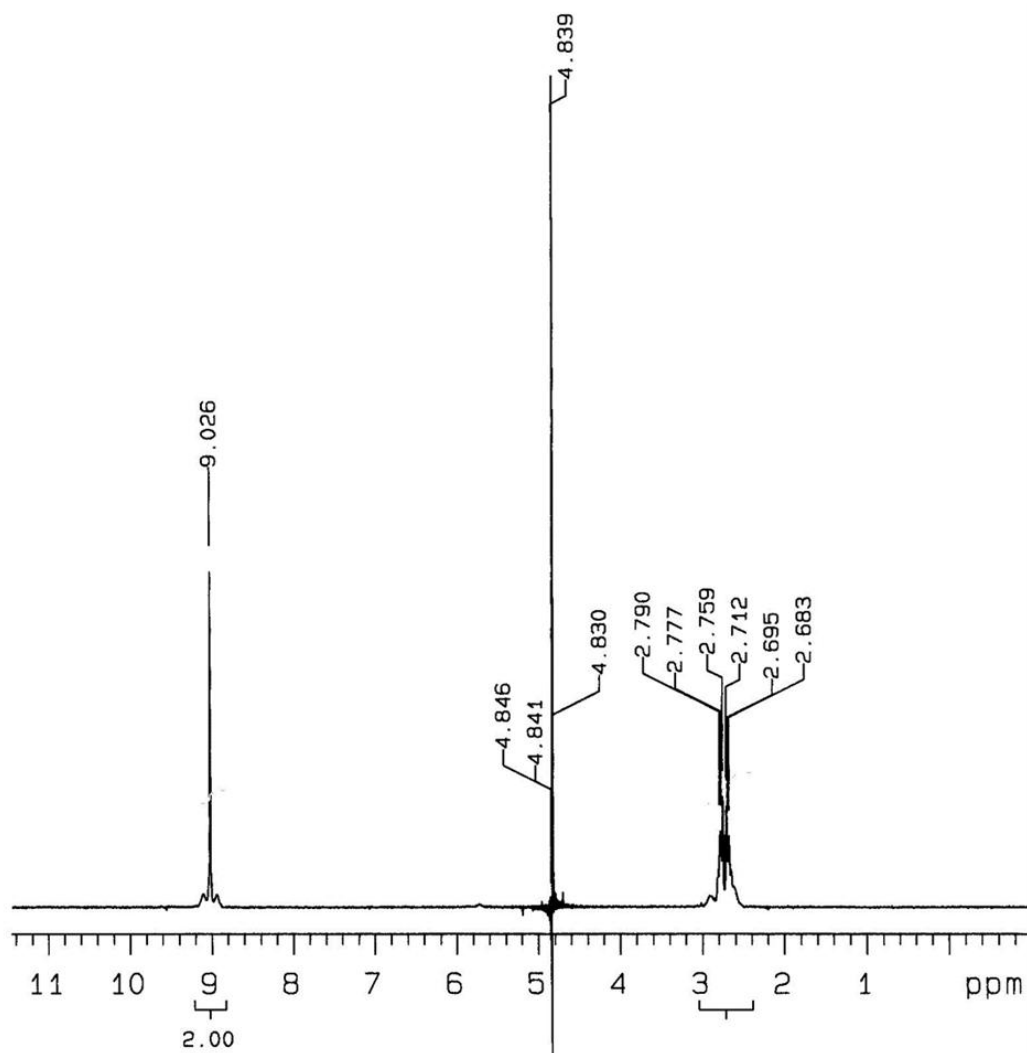
Слика 8. UV–vis спектри динуклеарних комплекса платине(II).

4.6. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА Pt1–Pt9 КОМПЛЕКСА НА ОСНОВУ ^1H И ^{13}C NMR СПЕКТРОСКОПИЈЕ

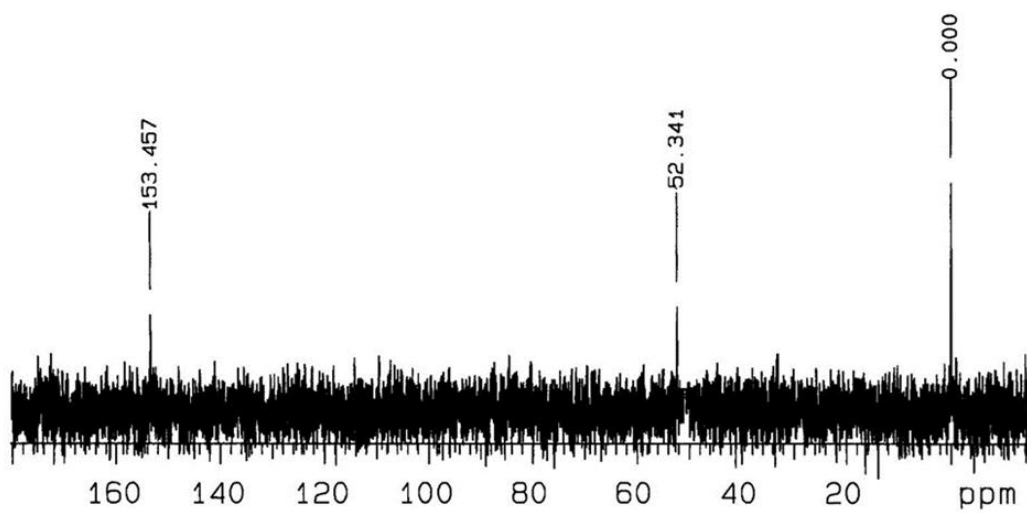
Нуклеарно-магнетно-резонантни спектри комплекса су снимљени на Природно-математичком факултету, Универзитет у Крагујевцу, на Varian Gemini-2000 NMR спектрофотометру. Коришћени су као растварачи D_2O и $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ($\text{DMSO-}d_6$) и референтни стандард TSP (натријум-3 (триметилсилил) -пропионат-2,2,3,3- d_4). На основу њихових ^1H и ^{13}C NMR спектра, односно промене у померањима сигнала протона или ^{13}C угљеникових атома лигананда, може се потврдити њихова координација за јон Pt(II). На **сликама 9–17** су приказани су ^1H и ^{13}C NMR спектри синтетисаних динуклеарних комплекса платине(II).



Слика 9. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) Pt1.

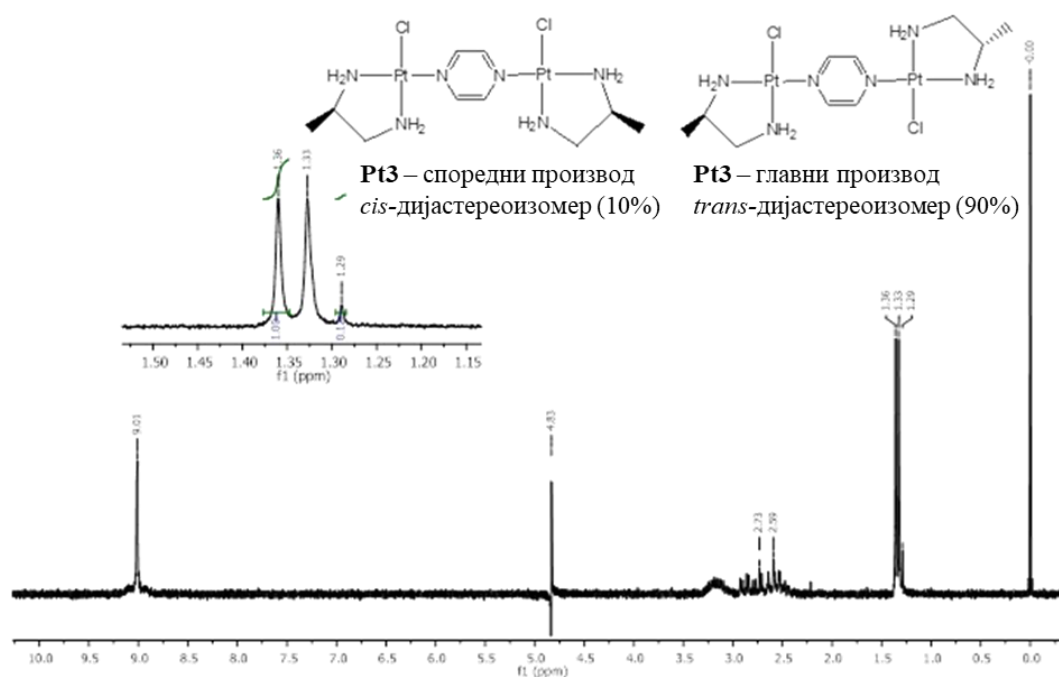


^1H NMR (200 MHz, D_2O) за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ (**Pt2**)

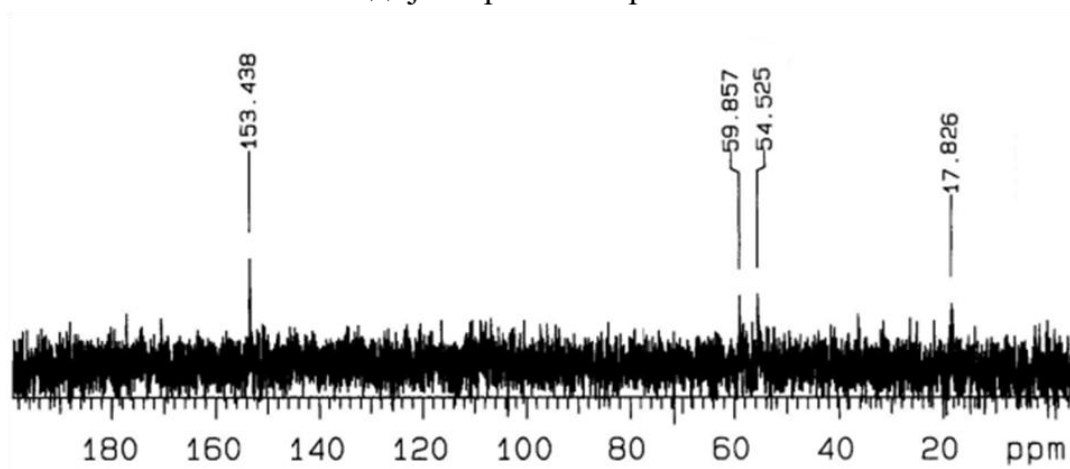


^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) за $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ (**Pt2**)

Слика 10. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt2**.

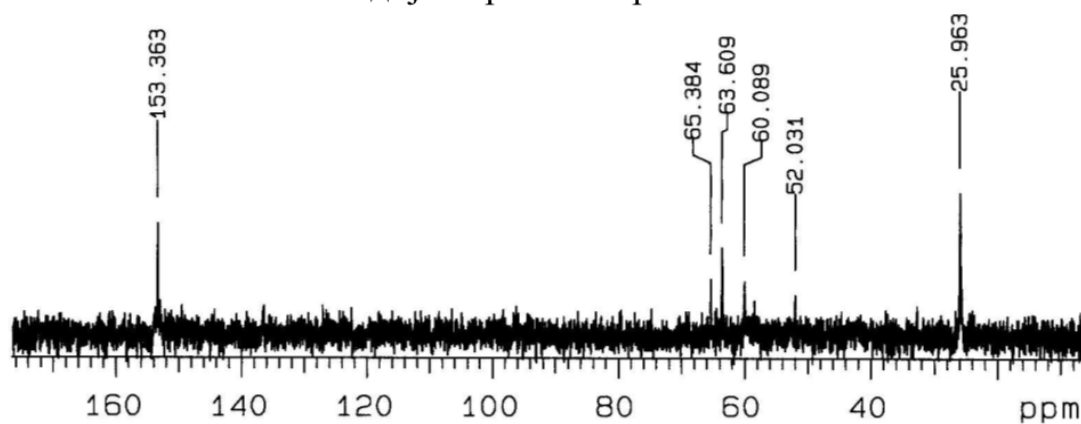
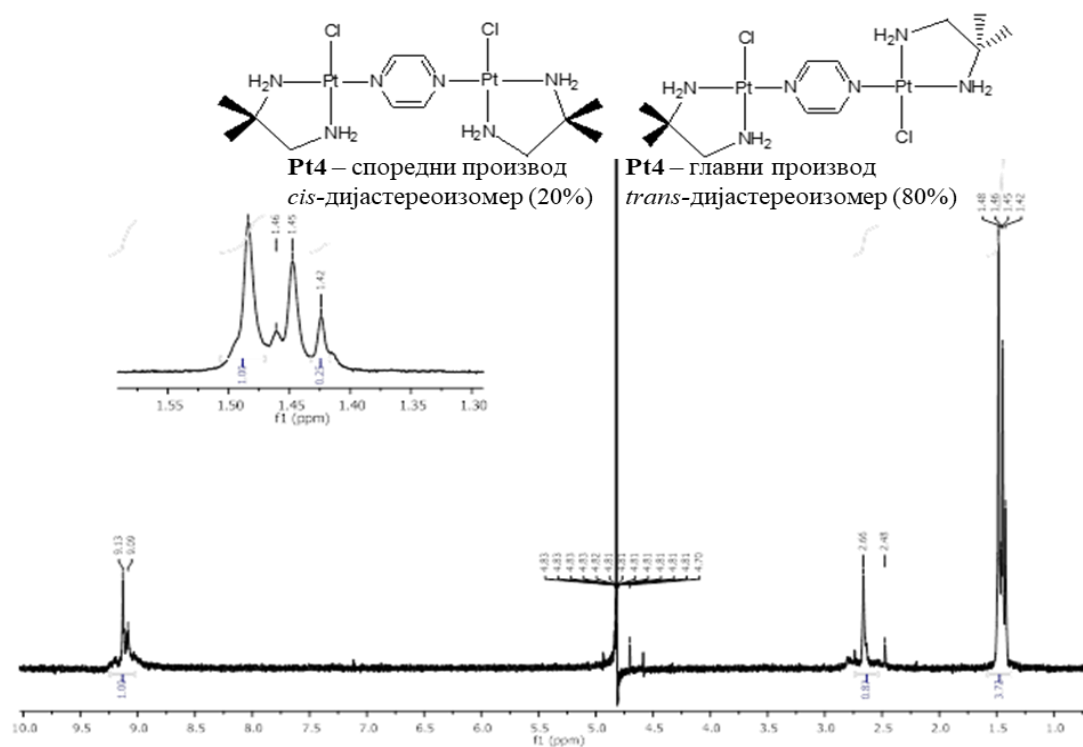


^1H NMR (200 MHz, D_2O) за $\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ (**Pt3**) са уметнутим делом спектра са интегралним сигнализима за дијастереоизомере

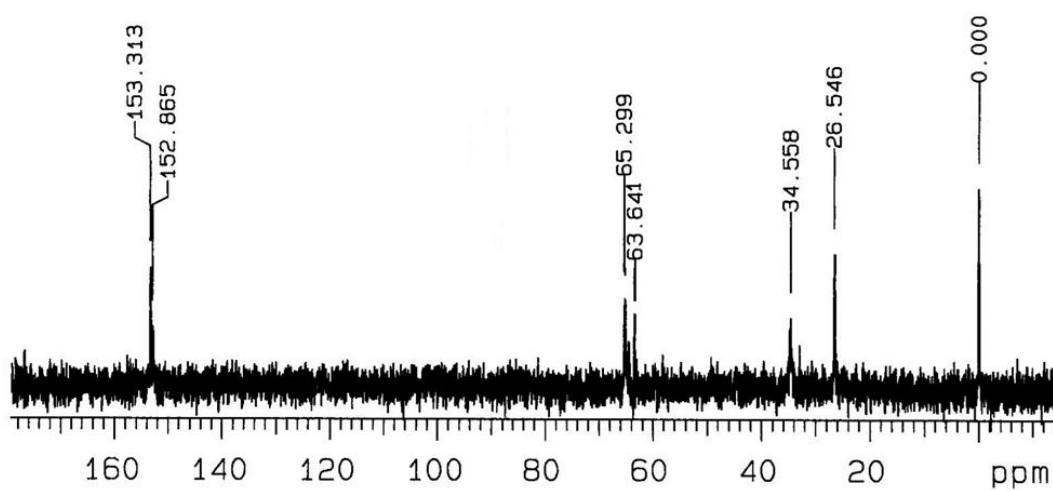
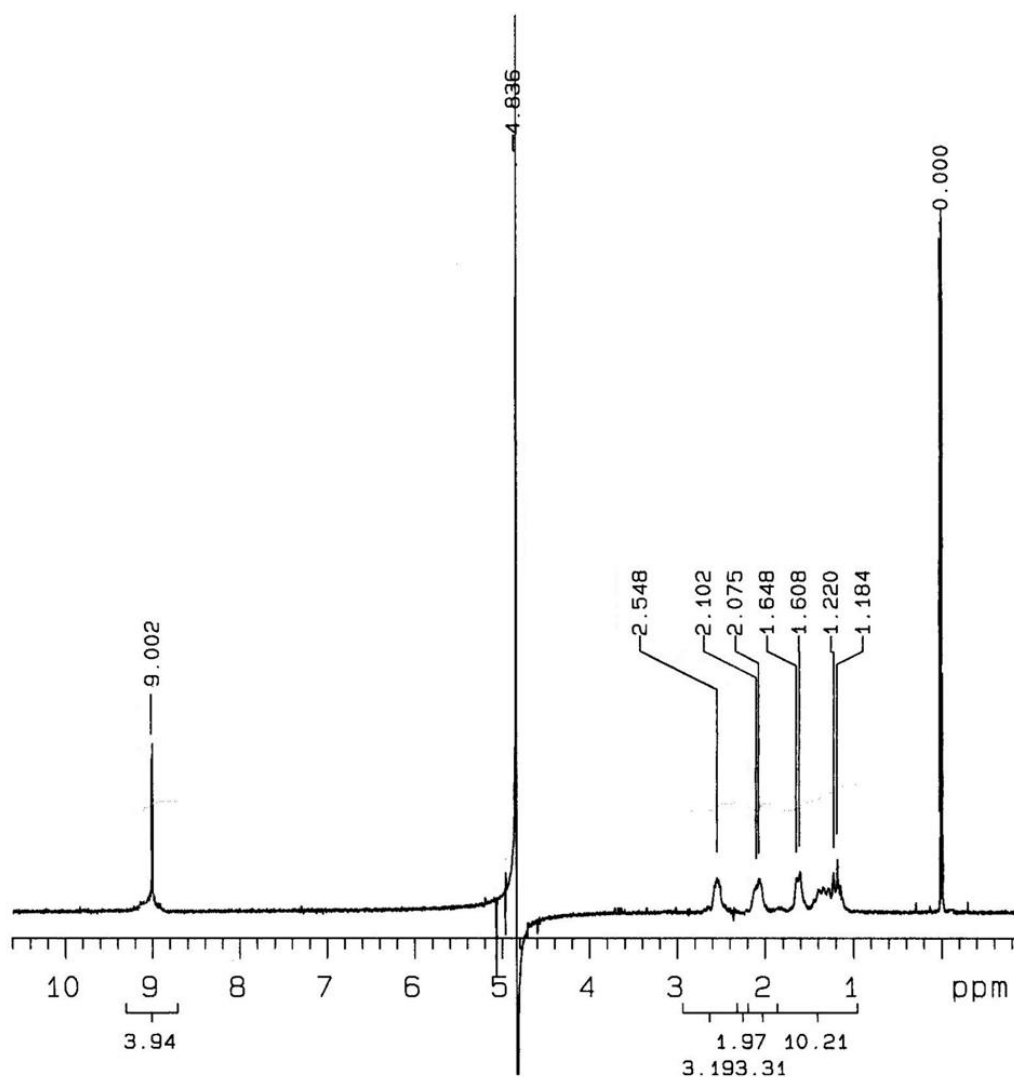


^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) за $\{[\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pz})\}\text{Cl}_2$ (**Pt3**)

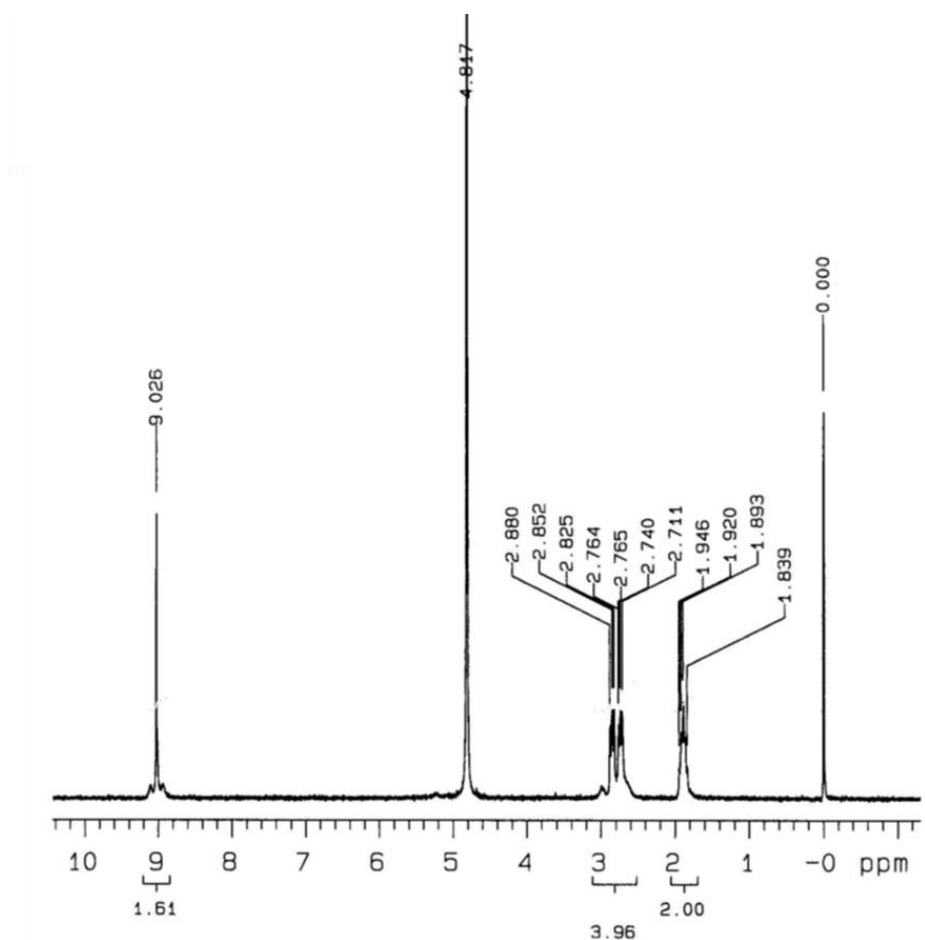
Слика 11. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt3**.



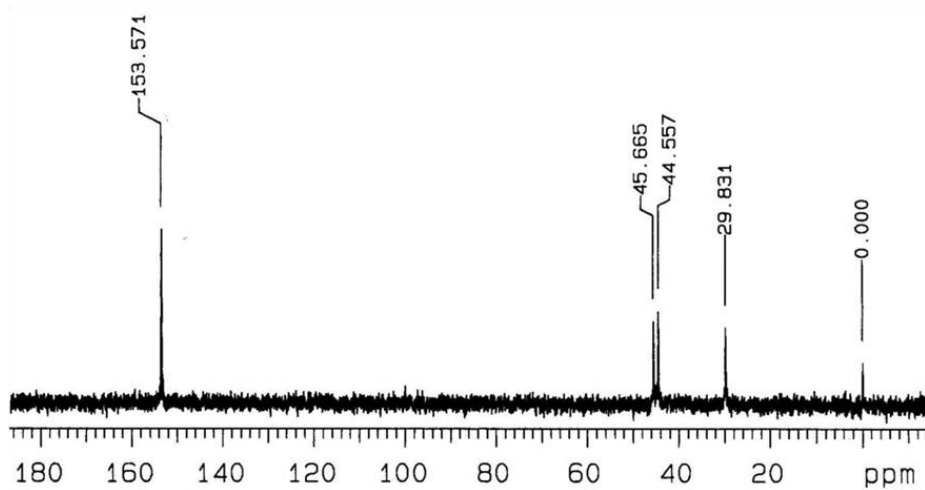
Слика 12. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt4**.



Слика 13. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt5**.

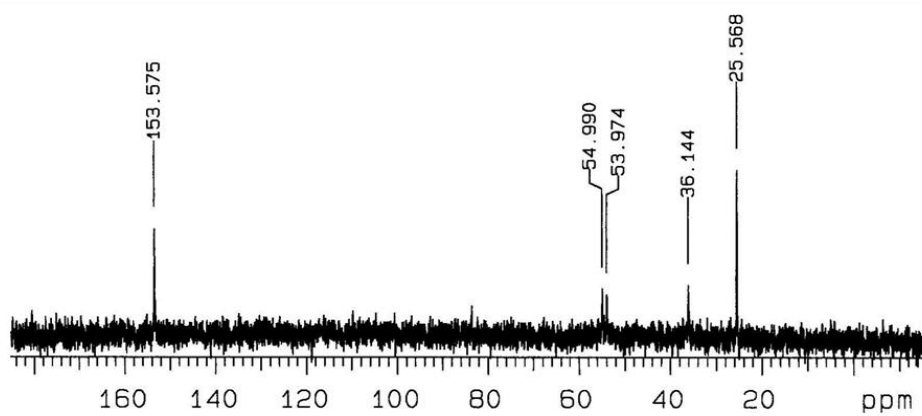
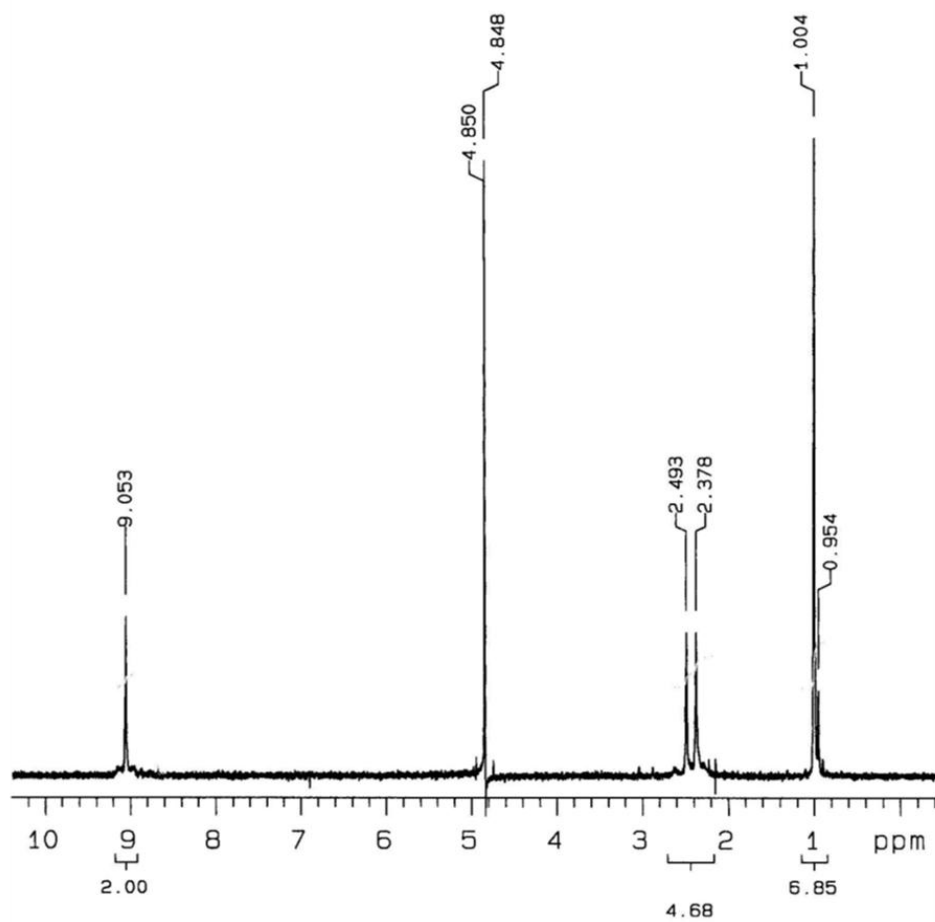


^1H NMR (200 MHz, D_2O) за $[\{\text{Pt}(1,3\text{-pd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{LiCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Pt6**)

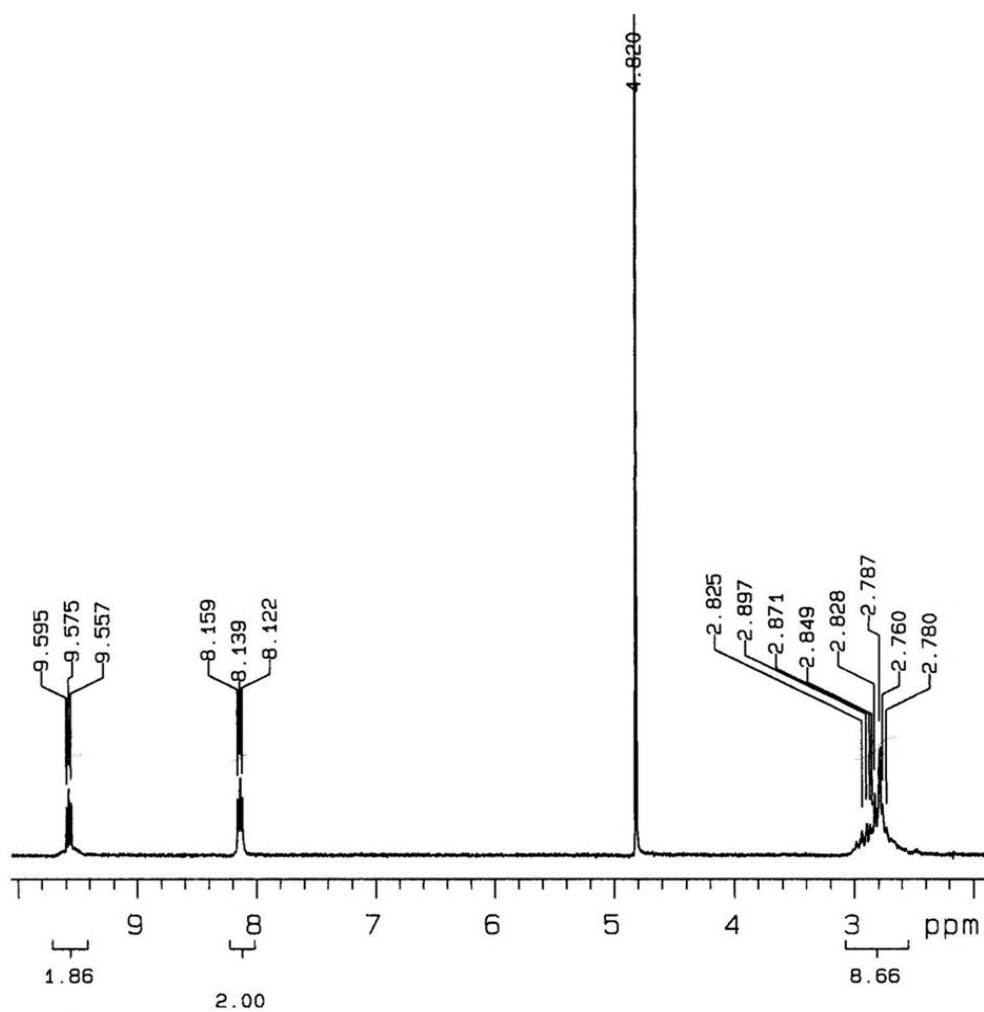


^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) за $[\{\text{Pt}(1,3\text{-pd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pz})]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{LiCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Pt6**)

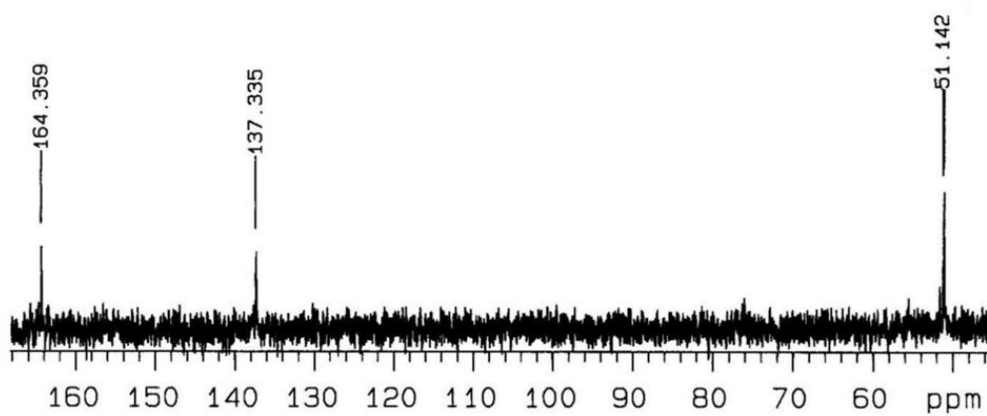
Слика 14. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt6**.



Слика 15. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt7**.

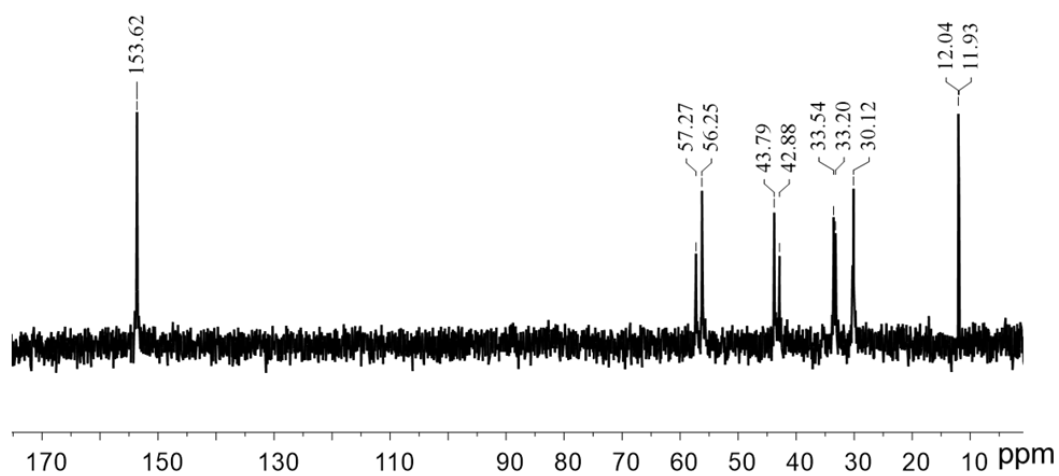
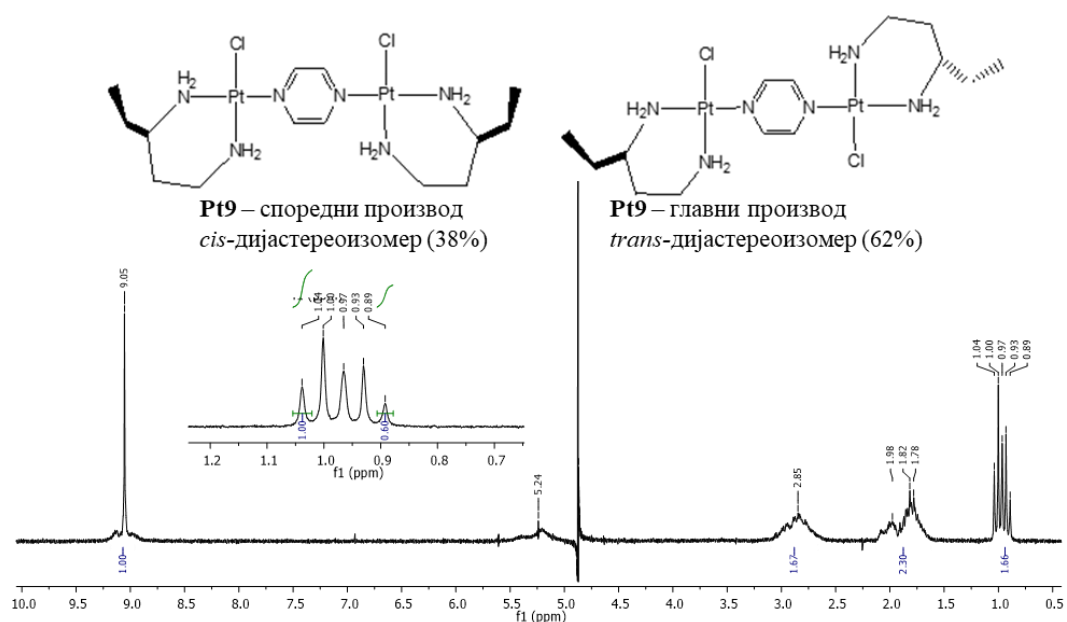


^1H NMR (200 MHz, D_2O) за $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ (**Pt8**)



^{13}C NMR (50 MHz, D_2O) за $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ (**Pt8**)

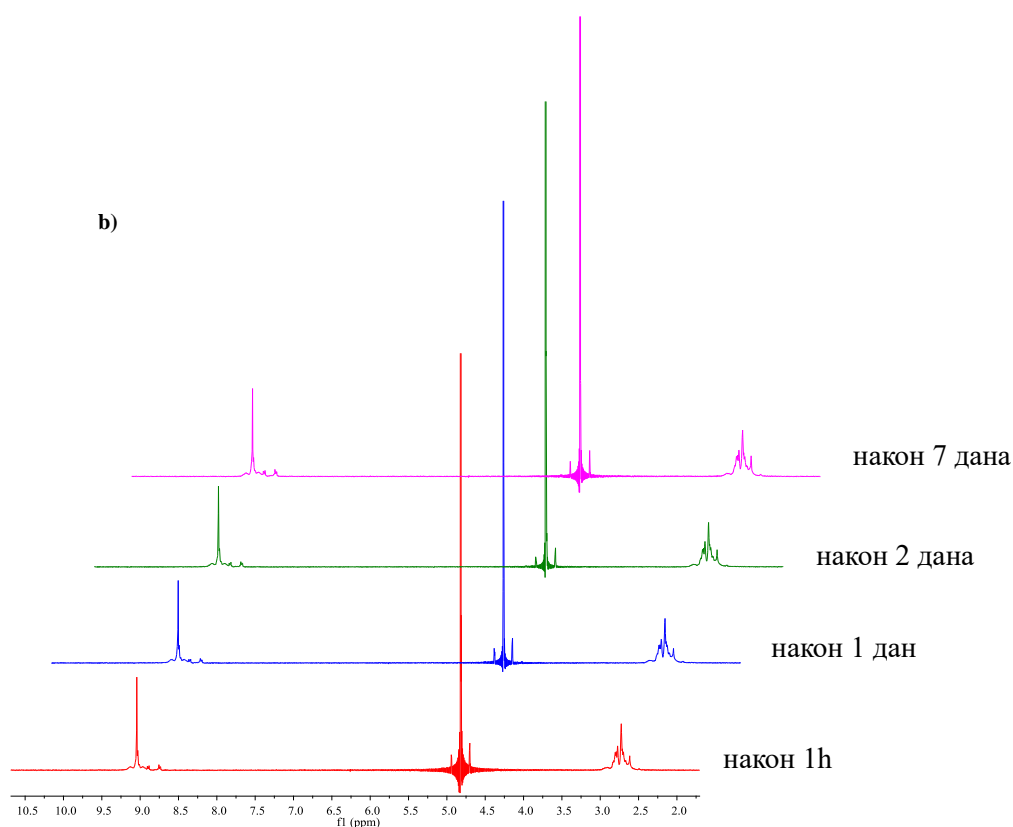
Слика 16. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt8**.



Слика 17. ^1H и ^{13}C NMR спектар синтетисаног комплекса платине(II) **Pt9**.

4.6.1 Стабилност динуклеарних $\{[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]_2(\text{X})\}\text{Cl}_2$ комплекса

Стабилност комплекса **Pt1–Pt9** је испитивана ^1H NMR спектроскопијом у различитим временским интервалима ($t = 1$ сат, 1 дан, 2 дана и 7 дана). Раствори свих комплекса припремљени су у 0,01 М PBS пуферу (pH 7,4). Узорци су између мерења чувани на собној температури. Нису уочене промене у NMR спектрима проучаваних комплекса **Слика 18**.



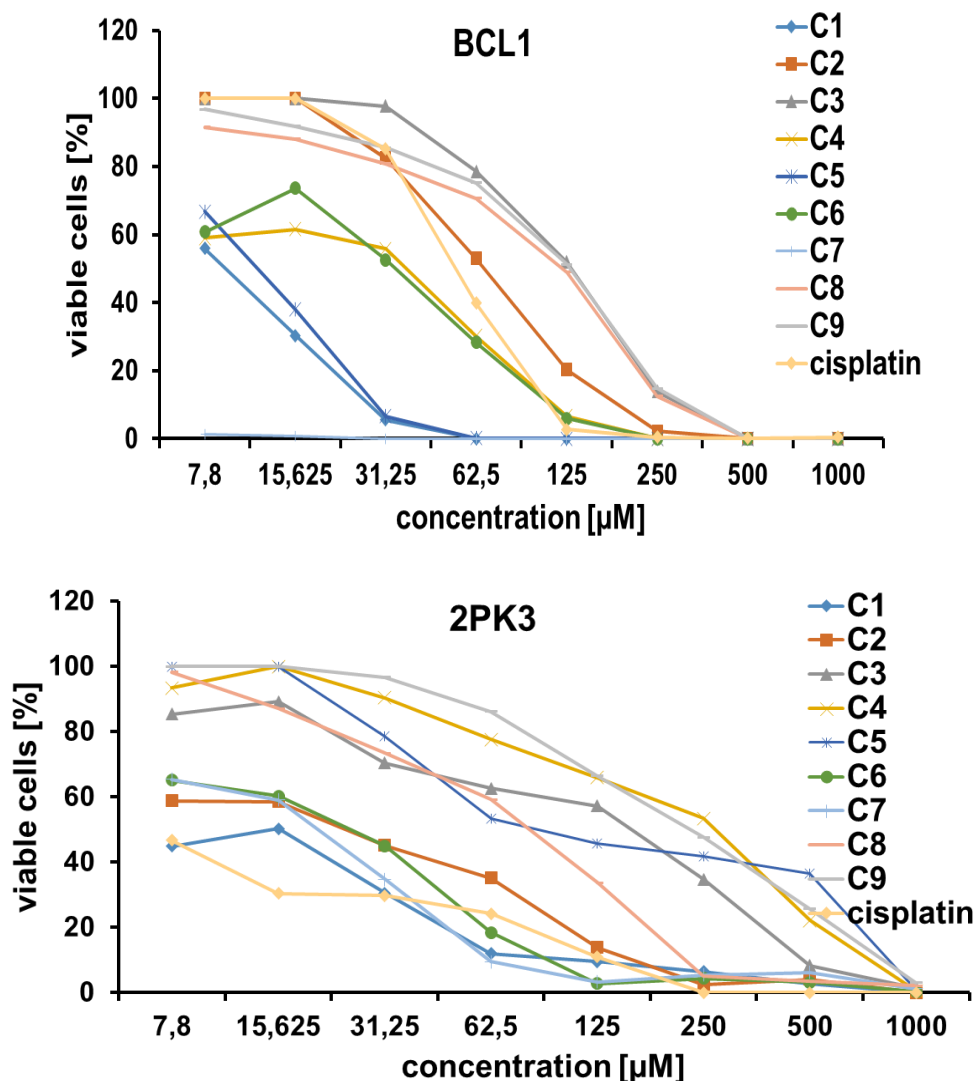
Слика 18. Стабилност **Pt2** комплекса праћена ^1H NMR спектроскопијом у 0,01 М PBS пуферу (pH=7,40). Сва мерења су вршена у различитим временским интервалима и на собној температури.

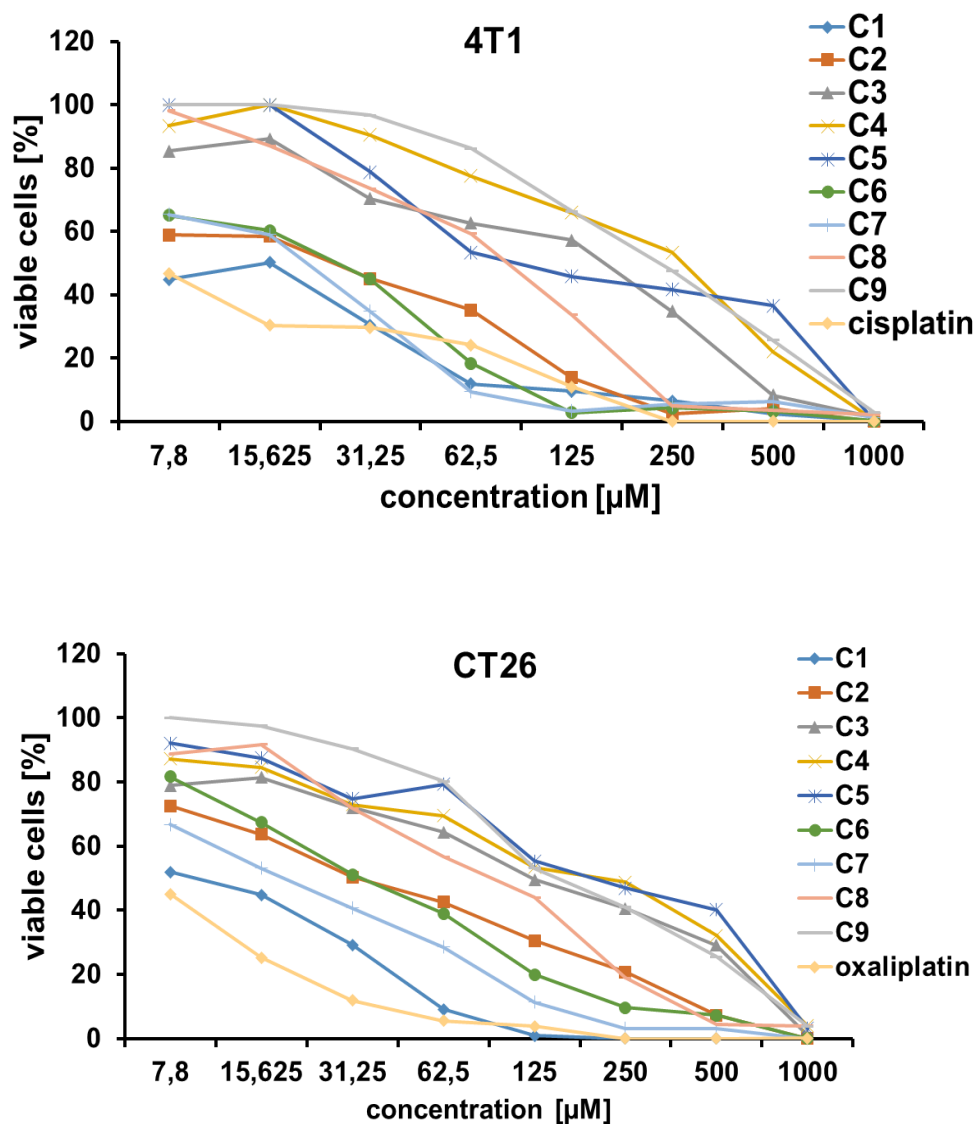
4.7. ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ *in vitro*

4.7.1. Цитотоксичност комплекса платине(II) испитана МТТ тестом

За испитивање антитуморског потенцијала *in vitro* динуклеарних комплекса платине(II) користили смо стандардно гајену СТ26 (ATCC[®] CRL-2638[™]) ћелијску линију. За *in vitro* испитивања су коришћене и ћелијска линија лимфома миша 2PK3 (ATCC[®] TIB-203[™]), хроничне лимфоцитне леукемије миша BCL1 (ATCC[®] TIB-197[™]) и карцинома дојке миша 4T1 (ATCC[®] CRL-2539[™]). Како би се упоредила цитотоксична активност испитиваних супстанци, као референтно једињење коришћена је цисплатин за ћелијске линије 2PK3, BCL1 и 4T1, и оксалиплатин за ћелијску линију СТ26.

Дозна зависност цитотоксичног ефекта испитиваних комплекса приказана је графикаону 1, а упоредо су приказане добијене IC₅₀ вредности испитиваних комплекса у табели 1.





Графикон 1 Резултати су приказани као средња вредност три узастопна понављања. Цитотоксичност комплекса платине(II) на ћелијским линијама миша BCL1, 2PK3 4T1 и CT26 након 72 часа излагања (мерени МТТ тестом). На графикону је приказана дозна зависност ефекта свих комплекса.

Добијени резултати показују да свих девет комплекса платине(II) смањује вијабилност свих испитиваних туморских линија ћелија на дозно зависан начин.

Complex	CT26	BCL1	2PK3	4T1
C1	8.83±2.02	9.69±2.58	11.47±3.87	6.51±1.98
C2	29.89±6.21	68.24±11.27	76.48±8.57	22.74±6.53
C3	128.54±28.19	135.41±21.47	123.76±19.76	135.74±35.47
C4	122.52±32.71	38.76±7.41	48.73±9.17	272.58±48.14
C5	200.62±48.14	12.63±4.32	9.52±3.21	82.29±24.01
C6	30.10±5.18	35.43±6.87	39.25±7.47	20.54±5.87
C7	28.58±4.83	<< 7.8	<< 7.8	17.54±4.52
C8	74.15±9.21	121.48±13.97	141.69±18.73	73.79±8.47
C9	187.41±29.74	135.79±25.82	120.47±16.24	279.48±39.28
oxaliplatin	2.75±1.01			
cisplatin		52.47±7.86	2.75±1.01	78.23±9.43

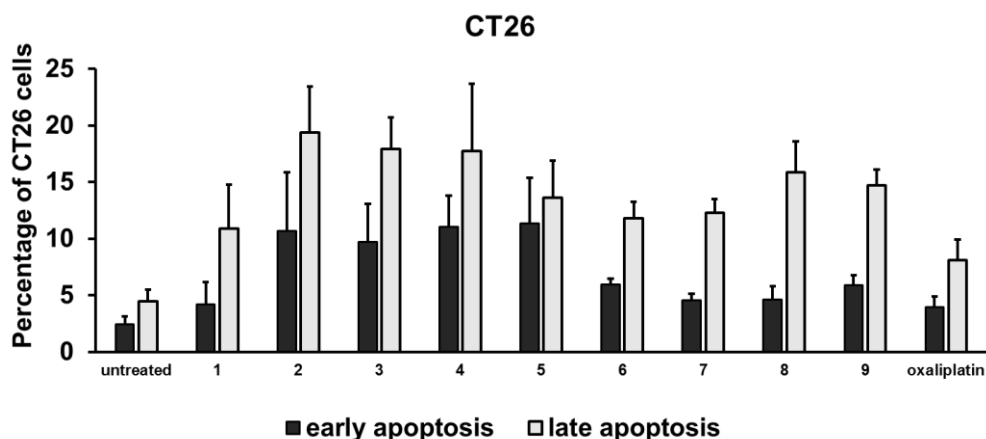
Табела 1 IC₅₀ (mM) вредности за комплексе након 72 часа излагања CT26, BCL1, 2PK3 и 4T1 ћелија израчунате на основу резултата МТТ теста. Подаци су приказани као средња вредност ± SD (стандардна девијација) резултата добијених из три независна експеримента.

Најизраженији ефекат на ћелијској линији карцинома колона миша CT26 показује комплекс **Pt1**, а комплекси **Pt2**, **Pt6** и **Pt7** показују висок степен цитотоксичности, у односу на оксалиплатин, као референтну супстанцу.

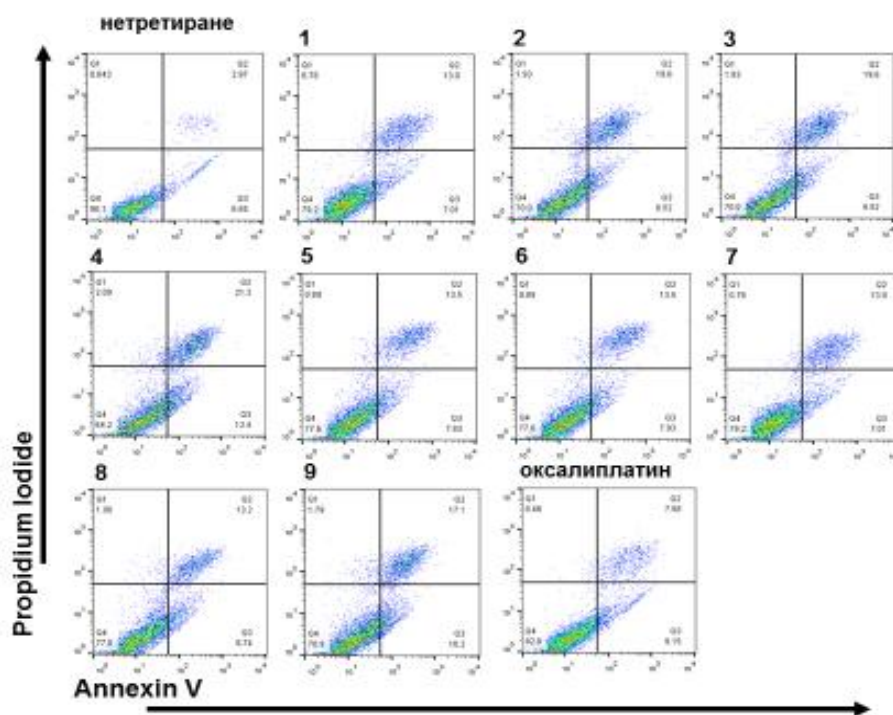
4.7.2. Квантитативно испитивање ћелија обојених Annexin V-FITC-ом

Након излагања испитиваним комплексима и оксалиплатину, CT26 ћелије су обојене анексином V и пропидијум-јодидом. Проточна цитометрија је метода којом је одређен проценат ћелија у раној апоптози (анексин V позитивне и пропидијум-јодид негативне) и касној апоптози (анексин V позитивне и пропидијум-јодид позитивне). Живим ћелијама се могу сматрати анексин V негативне и пропидијум-јодид негативне ћелије, док су анексин V позитивне и пропидијум-јодид позитивне ћелије уствари ћелије у некрози.

Свих девет испитиваних комплекса платине(II) индукује апоптотску смрт CT26 ћелија, што је приказано на **графикону 2**. Након двадесетчетири часа излагања комплексима платине(II) већина CT26 ћелија се налази у касној апоптози (анексин V позитивне, пропидијум-јодид позитивне). Након излагања комплексима платине(II) проценат CT26 ћелија у апоптози је већи у односу на проапоптотски капацитет оксалиплатине на ћелијама мишијег карцинома **слика 19**.



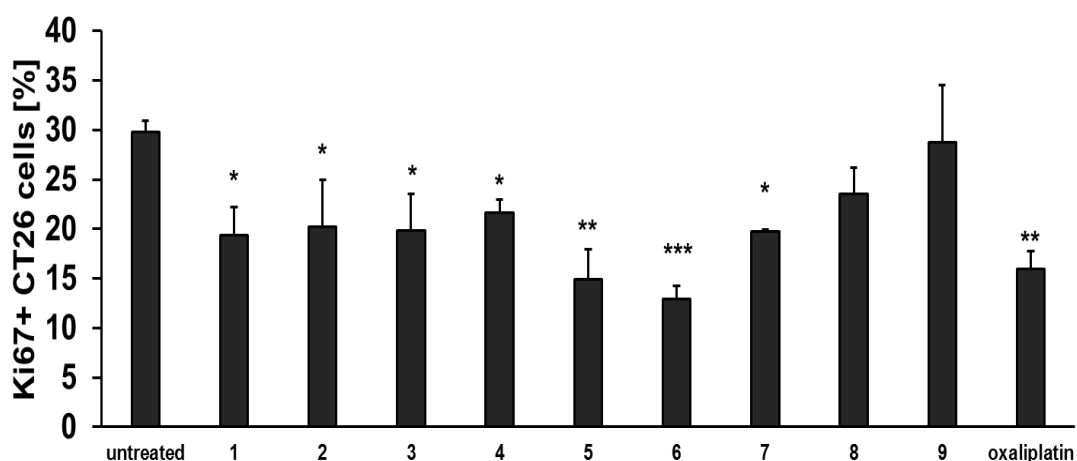
Графикон 2 Ефекат на апоптозу комплекса платине(II) на ћелијској линији карцинома колона миша CT26 након 24 часа излагања комплексима у концентрацији од 62,5 μ M. Контролне ћелије су нетретиране CT26 ћелије, гајене у чистом медијуму. Резултат је представљен као средња вредност \pm SD, за три независна експеримента.



Слика 19. Репрезентативни дот плотови туморских CT26 ћелија после двадесетчетворочасовног третирања комплексима платине(II) и оксалиплатином, и нетретираних контролних ћелија. Туморске ћелије су обојене анексином V и пропидијум-јодидом. Ћелије у раној апоптози су у горњем левом квадранту, ћелије у касној апоптози у горњем десном квадранту, вијабилне ћелије у доњем левом квадранту док су у доњем десном квадранту некротичне ћелије.

4.7.3. Испитивање антипролиферативног ефекта мерењем експресије Ki67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом на CT26 ћелијама

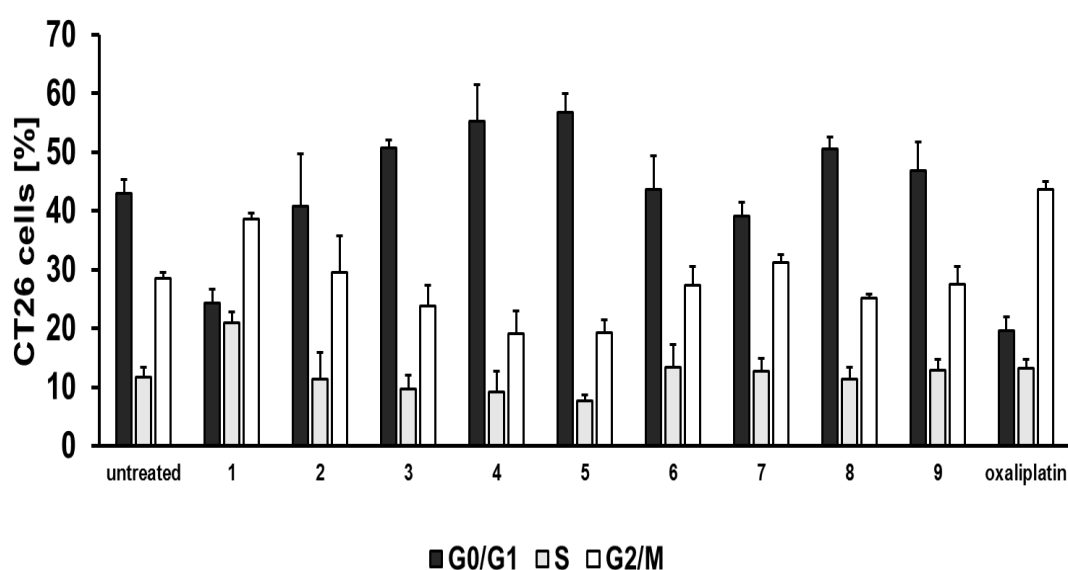
После двадесетчетворочасовног излагања испитиваним комплексима и оксалиплатини, CT26 ћелије су инкубирание Ki67 специфичним антителом коњугованим са флуоресцеин изотиоцијанатом. Проточни цитометар је детектовао проценат Ki67+ ћелија након 30 минута. CT26 туморске ћелије гајене у чистом медијуму коришћене су као контролне ћелије. Комплекси платине **Pt1–Pt7** испољавају антипролиферативни ефекат на CT26 ћелије, тј статистички значајно смањују проценат ових ћелија које експримирају Ki67. Разлика у проценту Ki67 позитивних ћелија у односу на нетретирание је најизраженији за комплексе **Pt5** ($p < 0,005$) и **Pt6** ($p < 0,001$). Процент Ki67+ CT26 туморских ћелија излаганих комплексу **Pt6** је статистички значајно мањи ($p < 0,05$) у односу на проценат CT26 ћелија излаганих оксалиплатини као контролној супстанци, као и у односу на проценат Ki67+ CT26 ћелија које нису третиране **графикон 3**.



Графикон 3 Процент Ki67 позитивних CT26 ћелија изложених комплексима платине(II), или оксалиплатини у концентрацији 62,5 μM за 24 сата, одређен на проточном цитометру. Подаци су приказани као средња вредност \pm SD (стандардна девијација) резултата добијених из три независна експеримента. Резултати су анализирани Студентовим t тестом, за * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

4.7.4. Анализа ћелијског циклуса

Да би се истражили могући ефекти комплекса платине(II) на ћелијски циклус, СТ26 ћелије третиране комплексима и бојене *Ruby* бојом у трајању од 24 часа заштићено од светлости на 37°C, су се користиле за детекцију ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса проточном цитометријом. Ова анализа је показала да је G0/G1 фаза ћелијског циклуса та у којој се налазе у највећем броју СТ26 ћелије третиране комплексима платине **Pt2**, **Pt3**, **Pt4**, **Pt5**, **Pt6**, **Pt8** и **Pt9**, као и нетретиране ћелије. Комплекси **Pt1** и **Pt7** заустављају СТ26 ћелије у у G2/M фази ћелијског циклуса **графикон 4**



Графикон 4 СТ26 ћелије третиране IC50 концентрацијама комплекса платине(II) и оксалиплатина, бојене *Vybrant® DyeCycle™ Ruby* бојом у трајању од 24 часа заштићено од светлости на 37°C су се користиле за детекцију ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса проточном цитометријом.

4.8. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ *in vivo*

Испитивани

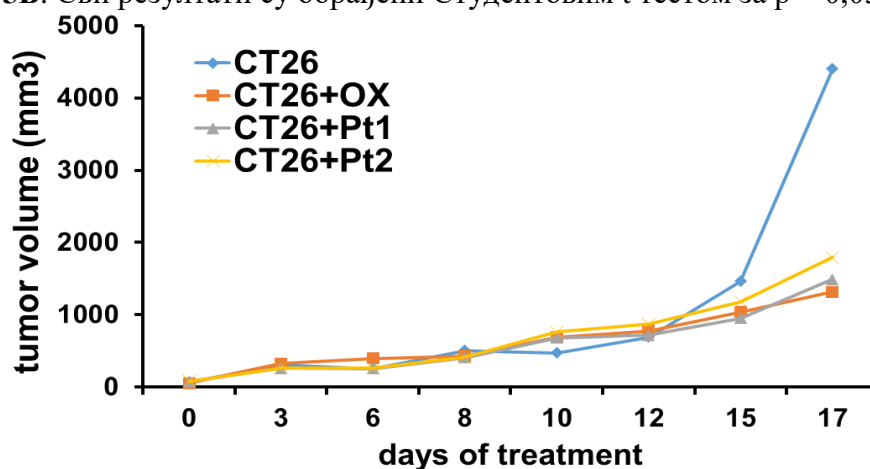
Након што су истраживања *in vitro* показала да испитивани комплекси платине(II) имају дозно и временски зависни цитотоксични ефекат на вијабилност ћелијских линија СТ26 и значајно повећавају проценат СТ26 ћелија у касној апоптози, даље истраживање је усмерено на испитивање антитуморске активности комплекса **Pt1** и **Pt2** *in vivo*. МТТ тест је показао да најизрженији ефекат на ћелијској линији карцинома колона миша СТ26 показује комплекс **Pt1**, а комплекси **Pt2**, **Pt6** и **Pt7** показују завидну цитотоксичност, у односу на оксалиплатин, као референтну супстанцу. Мерењем експресије Ki-67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом показано је да комплекси платине **Pt1–Pt7** испољавају антипролиферативни ефекат на СТ26 ћелијама. Због ових резултата, за даље испитивање антитуморског деловања *in vivo*, изабрали смо комплекс **Pt1** μ -пиразин-бис (диаминхлоридоплатина(II))-хлорид и комплекс **Pt2** μ -пиразин-бис (етилендиаминхлоридоплатина(II))-хлорид.

За експериментална анимална истраживања *in vivo*, коришћен је примарни етеротопски модел тумора колона миша изазван субкутаном применом СТ26 ћелија у дорзо лумбалну регију BALB/c мишева. Раст палпабилног примарног тумора праћен је свакодневно, уз истовремено одређивање његове запремине морфометријском методом. Запремина тумора се израчунава по формули $V \text{ (mm}^3\text{)} = L \text{ (највећи промер)} \times W^2 \text{ (најмањи промер}^2\text{)} / 2$. Палпабилан примарни тумор је настао и тада су експерименталне животиње почеле да добијају интраперитонеално испитиване комплексе, три пута недељно, три недеље. Експерименталне животиње су подељене у 8 група и то:

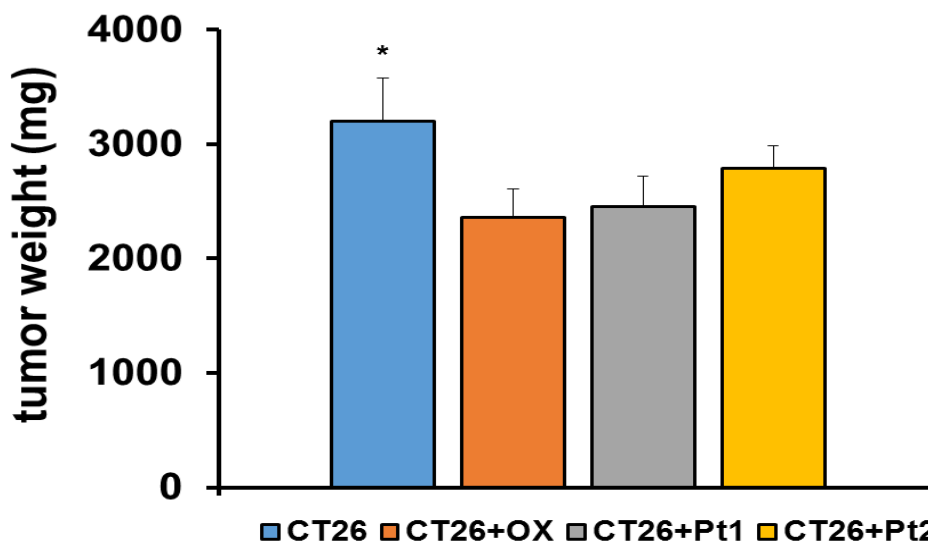
- група 1: СТ26 + физиолошки раствор,
- група 2: СТ26 + оксалиплатин,
- група 3: СТ26 + комплекс **Pt1**,
- група 4: СТ26 + комплекс **Pt2**,
- група 5: физиолошки раствор,
- група 6: оксалиплатин,
- група 7: комплекс **Pt1**,
- група 8: комплекс **Pt2**.

4.8.1. Комплекси платине Pt1 и Pt2 утичу на раст примарног тумора

Раст примарног тумора праћен је свакодневно уз истовремено морфометријско мерење његове запремине. Волумен примарног тумора код групе мишева којима су апликовани комплекси платине(II) је након петнаест дана смањен. Исти волумен након седамнаест дана се статистички значајно смањује ако упоредимо са запремином тумора група мишева којима су апликоване туморске ћелије и мишева којима је апликована оксалиплатин, **графикон 5А**. Тежина тумора мерена након некропсије је била значајно мања код мишева третираних **Pt1** и **Pt2** комплексима у поређењу са контролном групом. Међутим, тежина тумора мерена након некропсије није била значајно мања у групи мишева којима је након примене туморских ћелија апликована оксалиплатин, **графикон 5Б**. Сви резултати су обрађени Студентовим t тестом за $p < 0,05$.



Графикон 5А Криве дају приказ волумена тумора три недеље од примене комплекса платине, мереног у групама мишева.

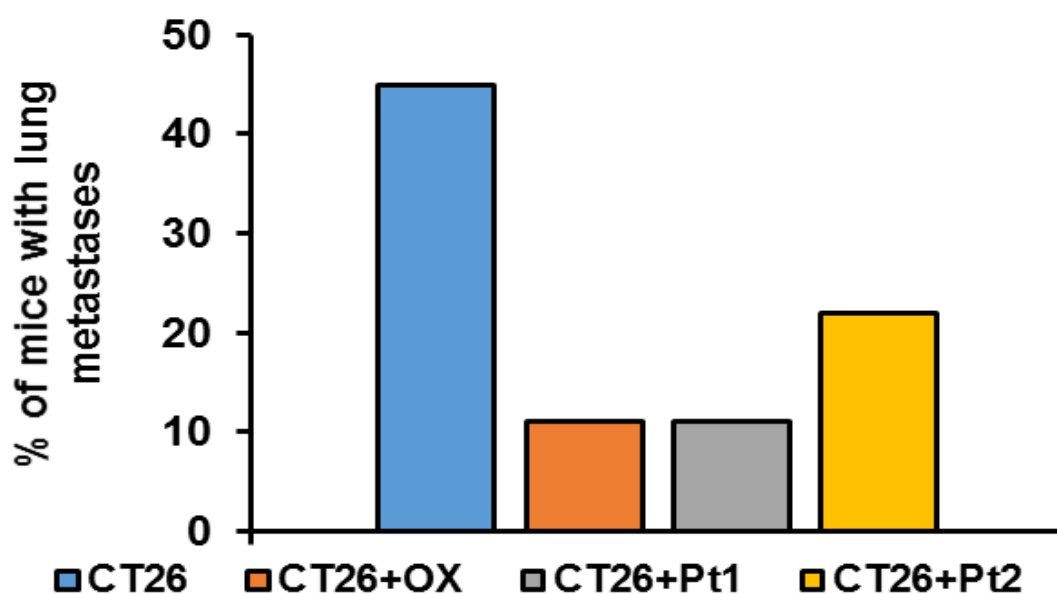


Графикон 5Б Графикон даје приказ средње вредности тежине тумора три недеље од почетка примене испитиваних супстанци, мереног у групама мишева.

4.8.2. Комплекси платине Pt1 и Pt2 испољавају антиметастатско дејство

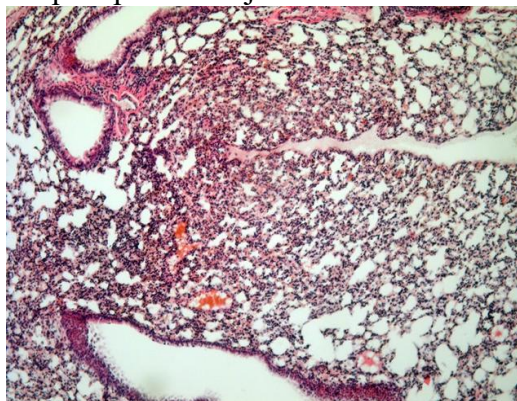
Антиметастатска активност **Pt1** и **Pt2** комплекса је процењена детекцијом метастатских жаришта у јетри и плућима третираних и нетретираних CT26 BALB/c мишева. Мишеви су били жртвовани три недеље након примене комплекса платине(II), а присуство метастаза је анализирано у пресецима обојеним хематоксилин еозином.

Хистолошка анализа плућа је показала да комплекси платине(II) смањују инциденцу метастазирања у плућима, **графикон 6**. Процент мишева који су испољили метастазе у плућима, а којима је апликован комплекс платине **Pt1** је готово исти као проценат метастаза код мишева којима је апликована оксалиплатин. Код приближно половине мишева који нису примали терапију после апликације туморских ћелија, развиле су се метастатске промене у плућима.

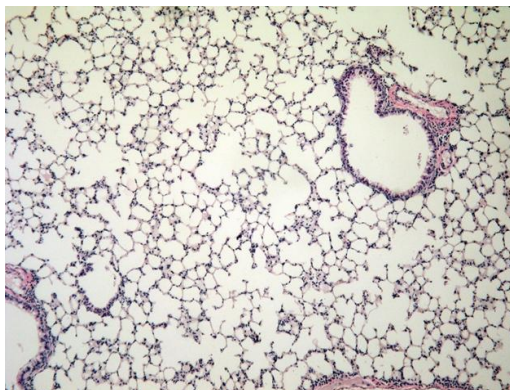


Графикон 6 Комплекси платине(II) смањују појаву метастаза у плућима, 17 дана након почетка третмана. Мишевима је осми дан апликован комплекс платине(II), или оксалиплатин или су добили физиолошки раствор.

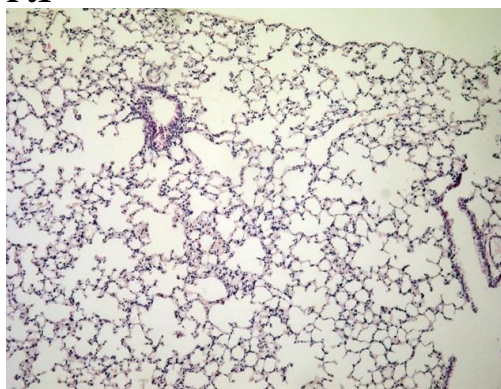
нетретиране ћелије



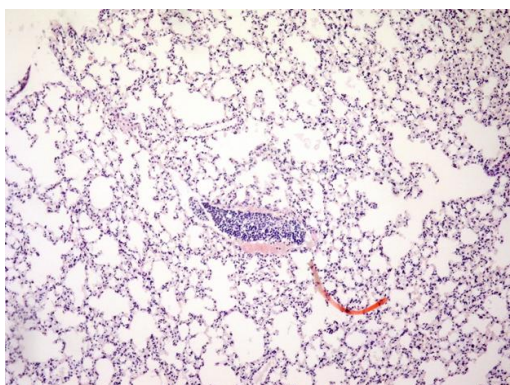
оксалиплатин



Pt1



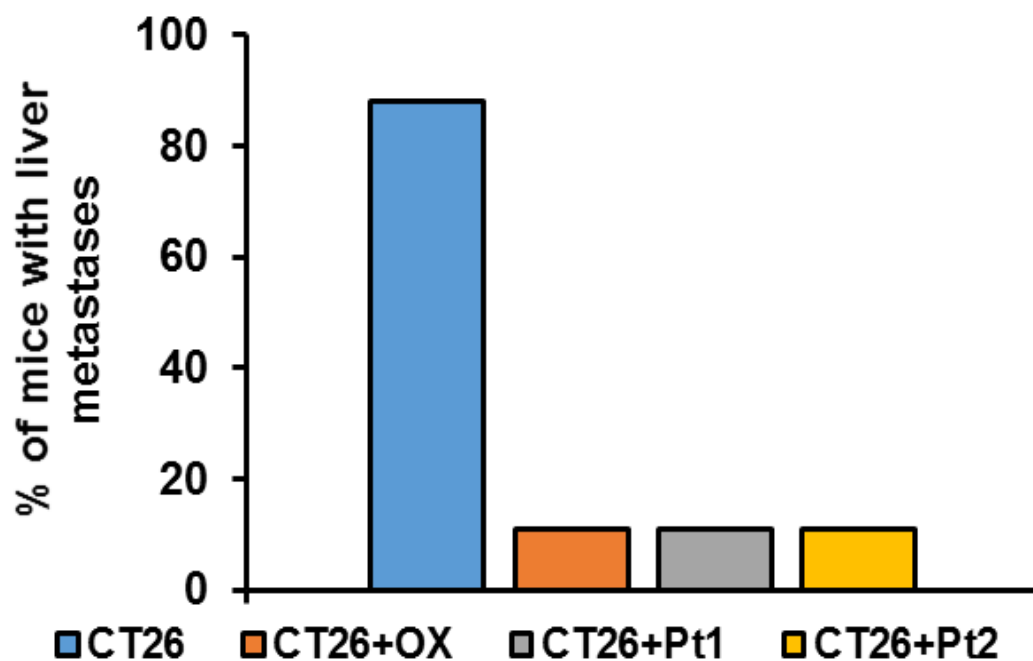
Pt2



Слика 20. Хистолошки исечци плућа обојени хематоксилином и еозином три недеље након примене комплекса платине(II) и 17 дана након почетка терапије.

Метастатске промене које су се у плућима развиле код миша коме је апликован комплекс платине **Pt2** не обухвата велику површину, док у плућима третираним комплексом **Pt1** и оксалиплатином се уочавају инципијентне метастазе. У плућима нетретираних мишева уочавају се дифузно туморске ћелије и поља крварења.

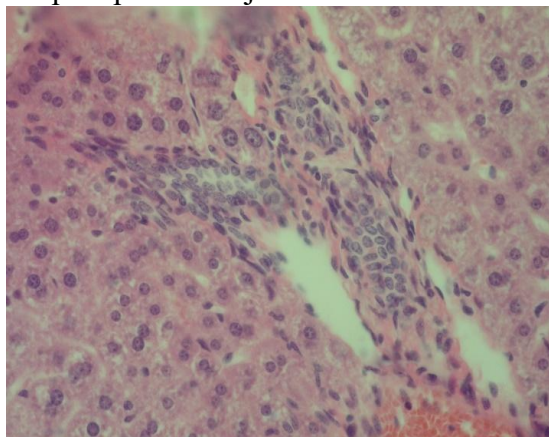
Резултати након патолошке анализе препарата јетре су приближно исти као резултати добијени анализом препарата плућа. Комплекси платине **Pt1** и **Pt2** смањили су инциденцу појаве метастаза у јетри **графикон 7**. Скоро сви мишеви који нису примали терапију након субкутане примене туморских ћелија, развиле су метастазе у јетри.



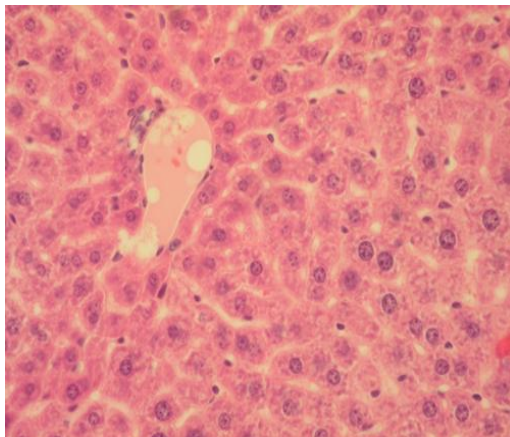
Графикон 7 Комплекси платине(II) смањују појаву метастаза у јетри, 17 дана након почетка третмана. Мишевима је осми дан апликован комплекс платине(II), или оксалиплатин или су добили физиолошки раствор.

Површина метастаза које захватају паренхим јетре код мишева који нису третираны комплексима је већа ако упоредимо са величином метастаза у јетри мишева којима су апликовани комплекси платине **Pt1** и **Pt2** **Слика 21**.

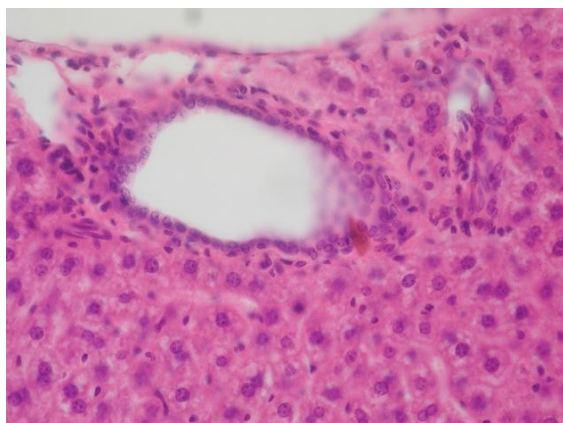
нетретиране ћелије



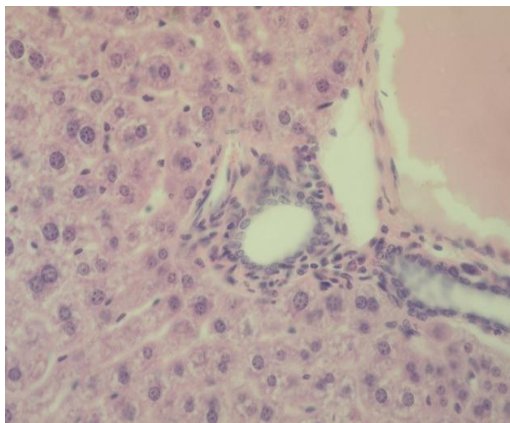
оксалиплатин



Pt1



Pt2



Слика 21 Хистолошки исечци јетре обојени хематоксилином и еозином три недеље након примене комплекса платине(II) и 17 дана након почетка терапије.

4.8.3. Комплекси платине Pt1 и Pt2 не испољавају токсичност

У серуму експерименталних животиња одређена је концентрација трансминаза (AST и ALT) које су показатељ евентуалне хепатотоксичности и урее и креатинина који могу указати на потенцијалну нефротоксичност. Анализирани су вредности у групама које су примале комплекс Pt1, комплекс Pt2 и оксалиплатин три недеље након трансплантације СТ26 туморских ћелија. Резултати указују да комплекси платине (II) не испољавају хепатотоксичност и нефротоксичност (табела 2). Када упоредимо све испитиване групе, анализом крви, видимо да није испољена статистички значајна разлика у вредностима трансминаза (AST и ALT), креатинина и урее.

	Уреа (mmol/L)	Креатинин (μ mol/L)	AST (U/l)	ALT (U/l)
Нетретирани	10,48 \pm 1,72	28,20 \pm 12,39	64,60 \pm 17,19	10,60 \pm 2,17
СТ26	10,45 \pm 1,19	36,00 \pm 4,39	114,83 \pm 41,05	10,50 \pm 5,80
СТ26 и оксалиплатин	9,12 \pm 2,93	28,40 \pm 7,91	105,40 \pm 25,64	15,50 \pm 3,35
СТ26 и Pt1	10,01 \pm 2,56	35,29 \pm 9,02	115,29 \pm 33,67	12,00 \pm 6,97
СТ26 и Pt2	9,68 \pm 1,04	30,17 \pm 2,39	94,50 \pm 9,81	21,17 \pm 3,21

Табела 2 Комплекси платине Pt1 и Pt2 не испољавају токсичност на јетру и бубреге. Концентрација урее, креатинина, аланинаминотрансферазе (ALT) и аспаратаминотрансферазе (AST) измерене 17. дана након апликације оксалиплатина и оба комплекса платине(II), по групама мишева. Нема статистички значајне разлике међу наведеним групама, одређено Студентовим t тестом.

5. ДИСКУСИЈА

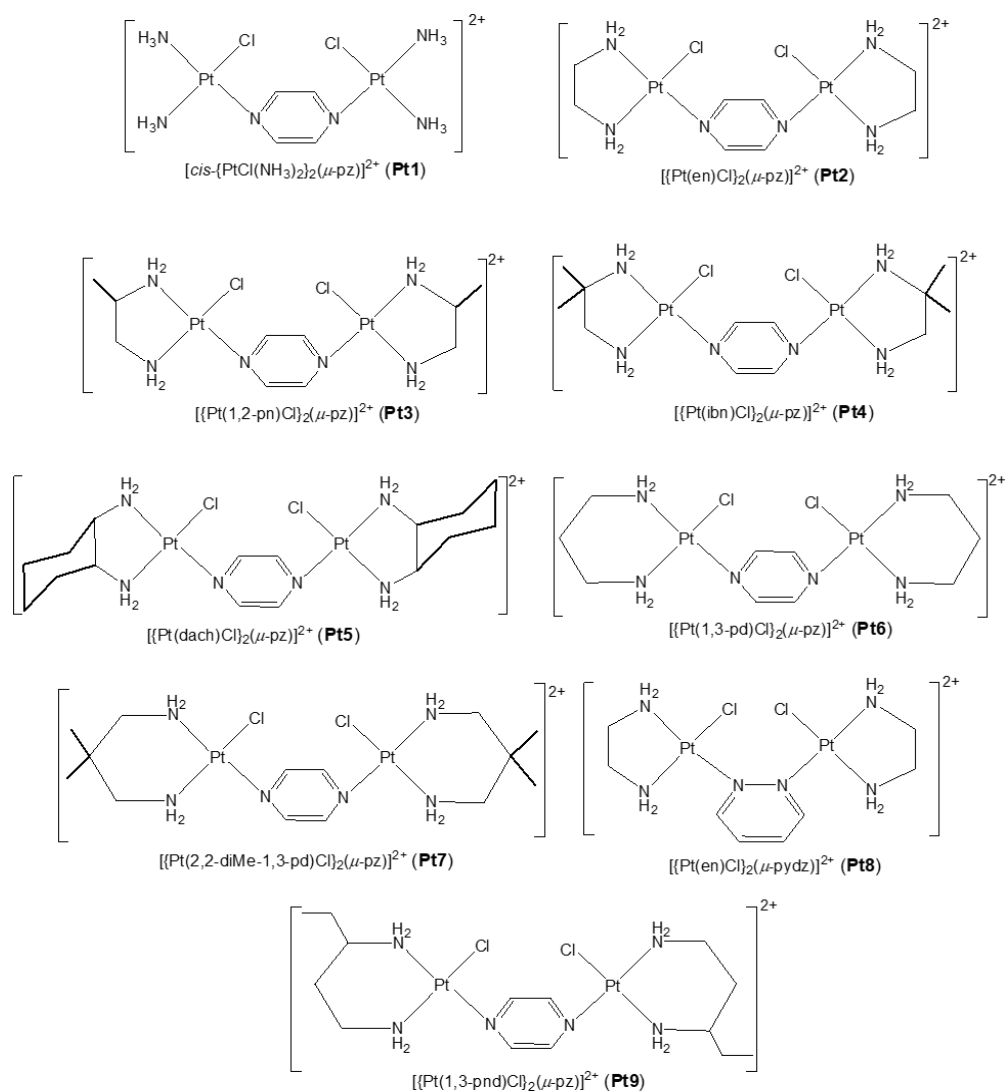
Рационални дизајн лекова на бази метала је релативно нов концепт, који се заснива на идентификацији биомолекула који би био циљно место за одређени лек, на основу етиологије самог тумора, а затим се приступа претраживању потенцијалних ефикасних једињења. (210). Највећи изазов и даље представља дистрибуција лекова на бази метала у циљно ткиво (211).

Открићем антитуморских особина цисплатина пре више од 40 година (*cis*-диаминдихлоридоплатина(II)), почела је њена примена у медицини. Проблем примене цисплатина је њено токсично дејство, ограничена растворљивост и појава резистенције након дуже примене (212, 213). У циљу проналажења комплекса мање токсичности, синтезом је добијен дијапазон различитих комплекса платине(II) од којих су најпознатији карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин, лобаплатин и хептаплатин (2). Цисплатин испољава биолошки ефекат везивањем за ДНА и протеине инхибирајући транскрипцију и ДНА репликацију што доводи до апоптозе и/или некрозе ћелија (214) па се користи за лечење различитих тумора (215). Оксалиплатин ((*cis*-L-диаминциклохексан) оксалатоплатина(II)) је боље растворљива у води у поређењу са цисплатином и због тога остварује интензивније интеракције са РНК и протеинима Трећој генерацији, поред комплекса платине(IV), припадају и полинуклеарни комплекси платине(II) који садрже два или више јона метала међусобно повезаних мостним лигандима и према којима туморске ћелије показују мању резистентност (216). Ови комплекси у раствору постоје у катјонском облику и њихова растворљивост у води је већа у односу на неутралне комплексе (217 - 220), услед чега имају израженију способност интеракције са протеинима у ћелији,

Чињеница је да је клиничка примена оксалиплатина повећала петогодишње преживљавање оболелих од карцинома дебелог црева на 35 до 50%, као и да је довела до смањења појаве метастаза код 20 до 30% лечених (221). Ипак у око 40% случајева долази до развоја резистенције на терапију (222). Сензорна неуропатија као последица неуротоксичности оксалиплатина (223), као и развој резистенције на лек су условили развој нових терапијских стратегија у лечењу колоректалног карцинома.

5.1. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ДИНУКЛЕАРНИХ Pt(II) КОМПЛЕКСА, Pt1–Pt9

Девет динуклеарних платина(II) комплекса, **Pt1–Pt9**, чија је општа формула $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}^{2+}$, где је L координовани амински/диамински лиганд амонијак, (NH₃), етилендиамин (en), (±) -1,2-пропилендиамин (1,2-pn), изобутилендиамин (ibn), *trans*- (±) -1,2-диаминоциклохексан (dach), 1,3-пропилендиамин (1,3-pd), 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин (2,2-diMe-1,3-pd), (±) -1,3-пентандиамин (1,3-pnd), а X мостни лиганд пиразин (pz) или пиридазин (pydz) (слика 22), синтетисано је и окарактерисано на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене (IR), ултраљубичасте (UV-Vis) и нуклеарно-магнетно-резонантне (¹H и ¹³C NMR) спектроскопије.



Слика 22. Структурне формуле испитиваних динуклеарних комплекса платина(II) **Pt1–Pt9**.

5.1.1. ^1H MR спектроскопска анализа Pt1–Pt9 комплекса

Сви подаци добијени NMR (^1H и ^{13}C) спектроскопијом као и елементалном микроанализом били су у доброј корелацији са оним раније објављеним за сличне комплексе (224 - 228). Ових девет комплекса се разликују по структури амин/диамин лиганда (амонијак, етилендиамин, (\pm) -1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин, *trans*-(\pm) -1,2-диаминоциклохексан, 1,3-пропилендиамин, 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин, (\pm) -1,3-пентандиамин) (слика 22). Комплекс Pt1 је динуклеарни аналог цисплатине. У структури пет комплекса, координовани амински/диамински лиганди формирају петочлане хелатне прстенове (Pt2, Pt3, Pt4, Pt5 и Pt8), док у структури три комплекса формирају шесточлане прстенове (Pt6, Pt7 и Pt9). У случају мостног лиганда, само један комплекс (Pt8) садржи мање симетричан пиридазински лиганд, док су у свим осталим комплексима две платинске јединице повезане преко пиразина. Може се претпоставити да супституенти у структури етилендиамина или 1,3-пропандиамина у овим комплексима повећавају њихов стерни утицај и да на тај начин могу допринети њиховој различитој цитотоксичности и антитуморској активности.

NMR спектри Pt1–Pt9 комплекса су снимани на собној температури у деутеријум оксиду (D_2O) као растварачу (слике 9–17, одељак Резултати). ^1H и ^{13}C NMR хемијска померања за координоване диаминске лиганде L и диазинске мостне лиганде, pz и pydz, дата су у табели 3.

У ароматичној области ^1H NMR спектра Pt1–Pt9 комплекса, хемијска померања се састоје од синглета или мултиплета који одговарају протонима употребљеног диазинског мостног лиганда, пиразина или пиридазина. Ови сигнали се значајно разликују од оних за некоординовани пиразин или пиридазин и померени су на ниже поље (више хемијско померање) због делокализације наелектрисања након формирања катјона координацијом за јон Pt(II) (225 - 228). Померање сигнала на ниже поље се, такође, може приметити и у случају координованих аминских/диаминских лиганда у динуклеарним комплексима Pt(II) у поређењу са сигналима одговарајућих некоординованих (слободних) лиганда. Однос *cis/trans* дијастереоизомера за комплексе Pt3, Pt4 и Pt9 одређен је на основу ^1H NMR спектра (слике 9–17, одељак Резултати). Ови дијастереоизомери се не могу раздвојити и таква добијена смеша стереоизомера је коришћена за све даља испитивања. Кристална структура комплекса Pt9 је претходно одређена рендгенском структурном анализом и нађено је да је структура главног диастереоизомера *trans* геометрије (228).

комплекс	¹ H NMR			¹³ C NMR		
	X		L	X		L
	pz	pydz	алифатични протони	pz	pydz	алифатични протони
Pt1	9,05 s	-	-	154	-	-
Pt2	9,03 s	-	2,74 m (CH ₂)	153	-	52
Pt3	9,01 s	-	1,34 d (CH ₃), 2,72 m (CH ₂), 3,22 m (CH)	153	-	18, 55, 60
Pt4	9,13 s	-	1,44 m (CH ₃), 2,66 s (CH ₂)	153	-	26, 60, 64
Pt5	9,00 s	-	1,45 m (CH ₂), 1,92 m (CH ₂), 2,53 m (CH)	153	-	27, 35, 64, 65
Pt6	9,03 s	-	1,90 m (CH ₂), 2,80 m (CH ₂)	154	-	30, 45, 46
Pt7	9,05 s	-	1,00 s (CH ₃), 2,38 s (CH ₂), 2,49 s (CH ₂)	154	-	26, 36, 54, 55
Pt8	-	8,14 m, 9,58 m	2,80 m (CH ₂)	-	137 164	51
Pt9	9,06 s	-	1,00 t (CH ₃), 1,85 m (CH ₂), 2,82 m (CH ₂ /CH)	154	-	43, 44, 56, 57

Табела 3. ¹H и ¹³C NMR хемијска померања (δ , ppm) за динуклеарне комплексе платине(II) (**Pt1–Pt9**) у D₂O као растварачу и TSP као интерним стандардом.

5.1.2. UV-Vis спектрофотометријска карактеризација Pt1–Pt9 комплекса

На слици 8 (одељак Резултати) приказани су UV-Vis спектри Pt1–Pt9 комплекса. Као што се на основу спектра може видети, први апсорпциони максимум налази се у опсегу од 270 до 305 nm, док се други максимум налази у опсегу од 350 до 360 nm. Сви апсорпциони максимуми синтетисаних комплекса имају батохромно померање након координовања диазинског мостног лиганда (pz или pydz), због $\pi \rightarrow \pi^*$ електронских прелаза у хетероцикличном pz, односно pydz лиганду.

5.1.3. IR спектроскопска карактеризација Pt1–Pt9 комплекса

IR спектри Pt1–Pt9 комплекса снимљени су у опсегу $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$ показују траке које одговарају координованом диазинском мостном лиганду, pz или pydz, као и траке одговарајућег координованог аминског/диаминског лиганда (амонијак, етилендиамин, (\pm) -1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин, *trans*- (\pm) -1,2-диаминоциклохексан, 1,3-пропилендиамин, 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин, (\pm) -1,3-пентандиамин).

У IR спектрима динуклеарних комплекса платина(II) су уочене карактеристичне јаке траке у области од $3435 - 3040 \text{ cm}^{-1}$, које одговарају симетричним и асиметричним вибрацијама координованих аммина/диамина, амонијаку (NH_3), етилендиамину (en), (\pm) -1,2-пропилендиамину (1,2-pn), изобутилендиамину (ibn), *trans*- (\pm) -1,2-диаминоциклохексану (dach), 1,3-пропилендиамину (1,3-pd), 2,2-диметил-1,3-пропилендиамину (2,2-diMe-1,3-pd), (\pm) -1,3-пентандиамину (1,3-pnd). Траке средње јачине у области од $1590 - 1580 \text{ cm}^{-1}$, одговарају C=C и C=N вибрацијама мостног пиразина или пиридазина као мостног лиганда. Јаке траке на 1090 и 1070 cm^{-1} , као и трака средње јачине на 623 cm^{-1} , указују на постојање перхлоратног јона у спољашњој координационој сфери Pt9 комплекса, а потичу од ν (ClO) и δ (OClO) вибрација.

5.2. СТАБИЛНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА $\{\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2(\text{X})\}\text{Cl}_2$

Стабилност комплекса Pt1–Pt9 је испитивана ^1H NMR спектроскопијом у различитим временским интервалима ($t = 1 \text{ h}$, 1 дан, 2 и 7 дана). Раствори свих комплекса су припремљени у 0,01 M PBS пуферу (pH 7,40). Узорци су чувани на собној температури између мерења. У NMR спектрима испитиваних комплекса нису уочене значајне промене (слика 18, одељак Резултати). На основу ових резултата закључено је да су сви испитивани комплекси платина(II) стабилни у овом растварачу и погодни су за даља биолошка истраживања. Комплекси имају задовољавајућу стабилност у широком pH опсегу ($2,0 < \text{pH} < 8,0$), дуже од 24 часа (226).

5.3. ЦИТОТОКСИЧНА И МИТОТСКА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ *in vitro*

5.3.1. Комплекси платине(II) Pt1-Pt9 смањују вијабилност ћелија карцинома колона миша

За испитивање антитуморског потенцијала *in vitro* динуклеарних комплекса платине(II) МТТ тестом у овом докторату, користили смо СТ26 (АТСС® CRL-2638™) ћелијску линију. За *in vitro* испитивања су коришћене и ћелијска линија лимфома миша 2РК3 (АТСС® TIB-203™), хроничне лимфоцитне леукемије миша ВСL1 (АТСС® TIB-197™) и карцинома дојке миша 4Т1 (АТСС® CRL-2539™). Како би се упоредила цитотоксична активност испитиваних супстанци, као референтно једињење коришћена је цисплатина за ћелијске линије 2РК3, ВСL1 и 4Т1, и оксалиплатин за ћелијску линију СТ26. Добијени резултати показују да свих 9 комплекса платине(II) смањује вијабилност свих ћелијских туморских линија на дозно зависан начин.

На СТ26 ћелијској линији комплекс **Pt1** показао је највећу цитотоксичност (IC50 = 8,82 mM) што је нешто нижа вредност у поређењу са оксалиплатином (IC50 = 2,75 mM), након 72 часа излагања. Комплекси **Pt2**, **Pt6** и **Pt7** су показали висок степен цитотоксичности, у односу на оксалиплатин као референтну супстанцу, са вредностима IC50 око 30 mM. Како је процењено МТТ тестом, комплекси **Pt1** и **Pt2** су показали најбољи цитотоксични ефекат према СТ26 ћелијској линији.

Значајна цитотоксична активност катјонских динуклеарних комплекса платине(II) на хуманим ћелијама колоректалног карцинома и меланома је раније описана у литератури (217). Антипролиферативни потенцијал динуклеарних комплекса платине(II) у поређењу са цисплатином је тестиран на хуманим плућним фибробластима MRC5 и две хумане ћелијске линије карцинома, меланому А375 и раку дебелог црева НСТ116, МТТ тестом након третмана од 48 сати. Иако су сви комплекси показали цитотоксични ефекат на свим ћелијским линијама у концентрацијама до 50 μM, ћелије карцинома дебелог црева НСТ116 су испољиле већу осетљивост у поређењу са фибробластима и меланомом, што указује на специфичност ћелијске линије, те смо и ми сличну користили у овој дисертацији. Цитотоксични профили сваког комплекса су били константни за различите ћелијске линије, али мало другачији међу комплексима. Дозно зависна цитотоксичност коју је показао комплекс цисплатине била је упоредива са оном код комплекса **Pt2** (одговара комплексу **Pt1**) и комплекса **Pt3** (одговара комплексу **Pt2**), и комплексима **Pt7**, **Pt8** и **Pt9** (одговара комплексима **Pt6**, **Pt7** и **Pt8**), што је у корелацији са резултатима ове тезе. Из наведених резултата може се претпоставити да различите конформације између петочланих и шесточланих прстенова у поменутих комплексима играју пресудну улогу у њиховој различитој активности.

In vitro цитотоксичност комплекса **Pt1** је претходно испитивана на неколико хуманих ћелијских линија, укључујући меланом М19, карцином дебелог црева WIDR, рак дојке MCF7 и EVSA-T, карцином бубрега А498 и немикроцелуларни карцином плућа Н226 (229).

Комплекс **Pt1** и његова нитратна со су показали IC50 вредности веће од цисплатина, између 1,6 и 30 пута. На другој страни, комплекс **Pt1** је показао вредности IC50 1,8 и 5,8 пута нижим у поређење са цисплатином када се тестира против ћелијске линије леукемије миша осетљиве L1210 (0) и отпорне L1210 (cisPt) на цисплатин, ретроспективно (230).

5.3.2. Комплекси платине(II) Pt1-Pt9 изазивају апоптотску смрт СТ26 ћелија

Апоптозу, познату као програмирану ћелијску смрт, карактерише специфична каскада биохемијских догађаја, укључујући фрагментацију ДНК која доводи до смрти ћелије (231). Катјонски динуклеарни комплекси платине(II) *in vitro* цепају једну од ковалентних шећерно-фосфатних веза између нуклеотида ДНК, како је раније описана у литератури (217). Ово указује да би испитивани комплекси платине(II) могли да индукују апоптотичку смрт туморских ћелија.

Свих девет испитиваних комплекса платине(II) индукује апоптотску смрт СТ26 ћелија. Након двадесетчетири часа излагања комплексима платине(II) већина СТ26 ћелија се налази у касној апоптози (анексин V позитивне, пропидијум-јодид позитивне). Након излагања комплексима платине(II) проценат СТ26 ћелија у апоптози је већи ако упоредимо са проапоптотским капацитетом оксалиплатина на ћелијама мишјег карцинома. Највећи проценат апоптотичких СТ26 ћелија, посебно раних апоптотичких СТ26 ћелија, био је након излагања комплексима **Pt2**, **Pt3** и **Pt4**. Нижи проценат СТ26 ћелија третираних оксалиплатином у касној апоптози у поређењу са свим тестираним комплексима платина(II) је у складу са претходним налазима који указују на аутофагију СТ26 ћелија индуковану оксалиплатином (231)

И ранија студија је показала да **Pt1** комплекс платине индукује апоптозу на моделу ћелијских линија леукемије миша осетљиве на цисплатин L1210 (0) и отпорне на цисплатин L1210 (cisPt) (230). У литератури, динуклеарни комплекси платине(II) сличне структуре инхибирају раст туморских ћелија индукујући апоптозу проточном цитометријом двоструког бојења док у истој студији експерименти гел електрофорезе демонстрирају способност ових једињења да подстакну разградњу ДНК плазида рЕТ22b на скоро исти начин као оксалиплатин (232).

5.3.3. Комплекси платине(II) Pt1-Pt7 испољавају антипролиферативни ефекат на СТ26 ћелијама

Ki67 је протеин који се везује за ДНК који се експримује током ћелијског циклуса у пролиферацији, али не и код ћелија у мировању. Како су досадашњи резултати показали да сви комплекси платине(II) смањују вијабилност и да индукују апоптотску смрт СТ26 ћелија, испитали смо антипролиферативни потенцијал ових комплекса. После двадесетчетворочасовног излагања испитиваним комплексима и оксалиплатином, СТ26 ћелије су инкубирание Ки67 специфичним антителом коњугованим са флуоресцеин изотиоцијанатом Проточни цитометар је детектовао проценат Ки67+ ћелија након 30 минута. СТ26 туморске ћелије гајене у чистом медијуму коришћене су као контролне ћелије. Комплекси **Pt1-Pt7**, као и оксалиплатин, значајно су смањили проценат Ки67+ СТ26 ћелија. Међутим, комплекси **Pt5** и **Pt6** изазвали су најјаче смањење процента Ки67+ који експримују СТ26 ћелије, што сугерише да би ови комплекси могли имати јачу антипролиферативну активност од оксалиплатина. Процент Ки67+ СТ26 туморских ћелија излаганих комплексу 6 је статистички значајно мањи ($p < 0,05$) у односу на проценат СТ26 ћелија излаганих оксалиплатини као контролној супстанци, као и у односу на проценат Ки67+ СТ26 ћелија које нису третиране.

5.3.4. Комплекси платине(II) Pt1-Pt9 изазивају поремећаје ћелијског циклуса

Ћелијска пролиферација је строго контролисана ћелијским циклусом и заустављање ћелијског циклуса доводи до апоптозе (233). Познато је да многи конвенционални лекови против рака заустављају ћелије у G0/G1 или G2/M фази, а затим индукују апоптотичку ћелијску смрт (234). Да би се истражили могући ефекти комплекса платине(II) на ћелијски циклус, СТ26 ћелије третиране комплексима и бојене *Ruby* бојом у трајању од 30 минута заштићено од светлости на 37°C, су се користиле за детекцију ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса проточном цитометријом. Комплекси платине **Pt3**, **Pt4** и **Pt5** заустављају СТ26 ћелије у G0/G1 фази ћелијског циклуса, а комплекси **Pt1** и **Pt7** у G2/M фази. Оксалиплатин је такође изазвала заустављање СТ26 ћелија у G2/M фази. Она статистички значајно повећава број ћелија заустављених у G2 фази а смањује број ћелија које су заустављене у G1 фази, ако упоредимо са ћелијама које нису третиране комплексима. Познато је да је заустављање ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса један од могућих механизма за индукцију апоптозе (235). С друге стране, заустављање ћелија у G0/G1 фази обично зауставља размножавање ћелија, али нуди ћелијама могућност да поправе дефекте изазване антиканцерогеним агенсима (236). Дакле, могло би се претпоставити да најјача цитотоксична активност комплекса **Pt1** и **Pt7** процењена МТТ тестом, може бити у корелацији са чињеницом да они заустављају СТ26 ћелије у G2/M фази ћелијског циклуса.

5.4. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) НА СТ26 ЋЕЛИЈСКОЈ ЛИНИЈИ *in vivo*

5.4.1. Комплекси платине Pt1 и Pt2 смањују раст примарног тумора

Након што су истраживања *in vitro* показала да испитивани комплекси платине(II) имају дозно зависни и временски зависни цитотоксични ефекат на вијабилност ћелијске линија СТ26 и значајно повећавају проценат ћелија у касној апоптози, даље истраживање је усмерено на испитивање антитуморске активности комплекса Pt1 и Pt2 *in vivo*, у хетеротопском моделу карцинома колона миша. 21. дана експеримента (17 дана након почетка третмана), запремина тумора је значајно смањена код мишева третираних са Pt1 и Pt2 комплексима при чему је оксалиплатин имала веома сличан ефекат. Тежина примарних тумора мерена након некропсије је била значајно нижа код група мишева третираних Pt1 и Pt2 комплексима у поређењу са контролном групом али не и код групе која је после апликације ћелија тумора добијали оксалиплатин. Тежина тумора код мишева третираних оксалиплатином била је нешто мања од тежина тумора у групама третираним комплексима платина(II), али без статистичког значаја.

5.4.2. Комплекси платине Pt1 и Pt2 смањују метастазирање примарног тумора

Антиметастатска активност Pt1 и Pt2 комплекса је процењена детекцијом метастатских жаришта у јетри и плућима третираних и нетретираних СТ26 BALB/с мишева који носе тумор. Мишеви су били жртвовани три недеље након имплементације туморских ћелија, а присуство метастаза је анализирано у пресецима обојеним хематоксилин еозином.

Половина укупног броја мишева који нису третиран комплексима платина(II), након апликације туморских ћелија развиле су метастазе у плућима. Процент мишева третираних Pt1 комплексом и мишева третираних оксалиплатином, који су развиле метастазе у плућима, били су исти (10%), док је 22% мишева третираних Pt2 комплексом развило метастазе у плућима. Метастазе у плућима које су развиле мишеви третиран комплексом Pt1 покривају минималну површину, сличну површини коју покривају мишеви третиран оксалиплатином, док метастазе које су развиле мишеви третиран Pt2 комплексом показују ширење на паренхим.

Такође, скоро 90% нетретираних мишева који су субкутано примали само СТ26 ћелије, развиле су метастатске промене у јетри. Међутим, проценат мишева са развијеним метастазама у јетри је био значајно нижи у све три третиране групе мишева. Површина метастатских промена у паренхиму јетре мишева који нису примали терапију је већа ако упоредимо са величином метастатских жаришта у јетри мишева који су примали комплексе платине(II).

5.4.3. Комплекси платине Pt1 и Pt2 не испољаванју токсичност у јетри и бубрезима

Оксалиплатин се показала као значајан хемотерапеутик који има честу примену у онколошкој пракси у лечењу колоректалног карцинома. Доказано је да комбинација оксалиплатина са 5-флуороурацилом или леуковорином побољшава одговор пацијената на терапију (237). Примена оксалиплатина је праћена бројним веома честим нежељеним ефектима као што је оштећење нерава (периферна сензорна неуропатија) која изазива осећај трњења и укочености у прстима, око уста или у грлу, што може бити праћено и грчевима. Оксалиплатин изазива пролазно смањење броја крвних ћелија што може проузроковати настанак анемије (смањење броја црвених крвних зрнаца), абнормалних крварења (смањење броја крвних плочица) или инфекција (смањење броја белих крвних зрнаца). Лек оксалиплатин може проузроковати дијареју, умерену мучнину и повраћање, стоматитис и мукозитис, осећај бола у стомаку и друге гастроинтестиналне тегобе (238). Поремећаји и крвни угрушци у плућима се јављају често, док је ретко нежељено дејство појава ожиљака и задебљања на плућима праћена отежаним дисањем, што понекад може имати смртни исход. Оксалиплатин веома ретко изазива и токсично дејство на јетру (239). Код пацијената који су примали оксалиплатин у комбинованој хемотерапији, забележени су случајеви синдрома реверзибилне постериорне леукоенцефалопатије. То је ретко, реверзибилно неуролошко стање које брзо напредује и које може обухватити хипертензију, главобољу, конфузију, слепило и друге визуелне и неуролошке поремећаје.

Токсичност испитиваних комплекса у нашем раду је процењена мерењем јетриних ALT и AST ензима, урее, и креатинина у крви мишева 17. дана након апликавања испитиваних Pt1 и Pt2 комплекса и оксалиплатина. Није било уочене разлике у вредностима трансaminaза, урее и креатинина у крви мишева третираних Pt1, Pt2 и оксалиплатином у поређењу са контролном групом.

Резултати су показали да су комплекси Pt1 и Pt2 у тестираној концентрацији испољили токсичност за ћелије рака, али безбедни су за ћелије јетре и бубрега. Ови резултати су у складу са нашим претходним истраживањем које је показало да Pt6 и Pt8 нису били токсични нити тератогени за *zebrafish* ембрион. (217).

6. ЗАКЉУЧАК

У овом раду је синтетисано девет динуклеарних комплекса платина(II), Pt1–Pt9, чија је општа формула $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-X)\}^{2+}$, где је L координовани амински/диамински лиганд амонијак (NH₃), етилендиамин (en), (±) -1,2-пропилендиамин (1,2-pn), изобутилендиамин (ibn), *trans*- (±) -1,2-диаминоциклохексан (dach), 1,3-пропилендиамин (1,3-pd), 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин (2,2-diMe-1,3-pd), (±) -1,3-пентандиамин (1,3-pnd), а X мостни лиганд пиразин (pz) или пиридазин (pydz). Њихова карактеризација је извршена на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене (IR), ултраљубичасте (UV-Vis) и нуклеарно-магнетно-резонантне (¹H и ¹³C NMR) спектроскопије.

Цитотоксична активност серије од девет динуклеарних комплекса платине(II) (**Pt1–Pt9**) тестирана је МТТ тестом на ћелије карцинома дебелог црева миша (СТ26), који показује дозну зависност свих комплекса. Потенцијал Pt(II) комплекса да индукују апоптотску смрт одређен је проточном цитометријом нетретираних и третираних ћелија. Антипролиферативни ефекат комплекса платине(II) процењен је на основу ћелија СТ26 које су третиране са Ki67. Поред тога, антиметастатска активност **Pt1–Pt9** комплекса је процењена детекцијом метастатских жаришта у јетри и плућима третираних и нетретираних СТ26 ћелија код BALB/c мишева код којих је изазван тумор. Метастатске промене нису верификоване у мозгу жртвованих мишева.

Комплекси платине **Pt1** и **Pt2** смањују прогресију и раст примарног карцинома колоне сингених BALB/c мишева након субкутане апликације СТ26 ћелија, смањују вијабилност, пролиферацију СТ26 ћелија, изазивају њихову апоптотску смрт и то тако што комплекс **Pt1** зауставља СТ26 ћелије у G2/M фази циклуса, а комплекс **Pt2** у G0/G1 фази ћелијског циклуса.

Следећи резултата су довели до овог закључка:

- Синтетисано је девет комплекса платина(II) опште формуле $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)\}Cl_2$, где је X мостни лиганд, пиразин (pz) или пиридазин (pydz), а L је координовани амински/диамински лиганд (амонијак, етилендиамин, (±) -1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин, *trans*- (±) -1,2-диаминоциклохексан, 1,3-пропилендиамин, 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин, (±) -1,3-пентандиамин).
- Структура добијених комплекса **Pt1–Pt9** одређена је елементалном микроанализом, инфрацрвеном, ултраљубичастом и нуклеарно-магнетно-резонантном спектроскопијом. Стабилност ових комплекса је доказана ¹H NMR спектроскопијом праћењем у различитим временским интервалима.
- Комплекси платина(II) су испољили дозно зависни и временски зависни цитотоксични ефекат на вијабилност ћелијских линија СТ26, 2PK3, BCL1 и 4T1.
- Испитивани комплекси платина(II) значајно су повећали апоптозу СТ26 ћелија *in vitro*.
- Комплекси платине(II) **Pt2**, **Pt3**, **Pt4**, **Pt5**, **Pt6**, **Pt8** и **Pt9** *in vitro* у значајној мери су зауставили деобу ћелија у G0/G1 фази, док комплекси платине **Pt1** и **Pt7** су зауставили СТ26 ћелије у G2/M фази ћелијског циклуса.

- Комплекси платине **Pt1** и **Pt2** су смањили раст примарног тумора колоне BALB/c мишева изазваног субкутаном дорзолумбалном применом СТ26 ћелија.
- Комплекси платине **Pt1** и **Pt2** су смањили инциденцу метастазирања и проценат ткива захваћеног метастазама у у јетри и плућима.
- Комплекси платине **Pt1** и **Pt2** нису испољили значајан токсични ефекат *in vivo* у бубрезима и јетри.

7. ЛІТЕРАТУРА

- 1 Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1805:105-117.
- 2 Diaz-Cano SJ. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology* 2008;53:1-19.
- 3 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- 4 McClelland SE, Burrell RA, Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy. *Cell Cycle* 2009;8:3262-3266.
- 5 Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 2005;205:275-292.
- 6 Van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today* 2009;14(23-24):1089-97.
- 7 Alessio E. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, 2011.
- 8 Silverman AP, Bu W, Cohen SM, Lippard SJ. 2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(amine) (cyclohexylamine)]₂⁺ bound to a dodecamer DNA duplex. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277(51):49743-49749.
- 9 Peyrone M. Ueber die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorur. *Annalen der Chemie und Pharmacie* 1845;51:1.
- 10 Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 1965;205:698.
- 11 Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature* 1969;222:385.
- 12 Abu-Surrah AS, Kettunen M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Current Medicinal Chemistry* 2006;13:1337.
- 13 Muggia F. Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: Implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 2009;112:275.
- 14 Argyriou AA, Polychronopoulos P, Iconomou G, Chroni E, Kalofonos HP. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treatment Reviews* 2008;34:368.

- 15 Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and Comparative Oncology* 2008;6:1.
- 16 McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009;8:10.
- 17 Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 2014;740:364-378.
- 18 Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 2007;33:9.
- 19 Galanski M, Jakupec MA, Corrigendum to: Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. Keppler BK. *Current Medicinal Chemistry* 2005;1220:75.
- 20 Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003;7:481.
- 21 Bruijninx PCA, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008;12:197.
- 22 Lovejoy KS, Lippard SJ. Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. *Dalton Transactions* 2009;48:10651.
- 23 Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochemical Pharmacology* 1996;52(12):1855-1865.
- 24 Canetta R, Rozenzweig M, Carter SK. Carboplatin: the clinical spectrum to date. *Cancer Treatment Reviews* 1985;12 (Suppl.A):125.
- 25 Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Seminars in Oncology* 2002;29:11-20.
- 26 Ahn JH, Kang YK, Kim TW, Bahng H, Chang HM, Kang WC, Kim WK, Lee JS, Park JS. Nephrotoxicity of heptaplatin: a randomized comparison with cisplatin in advanced gastric cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2002;50:104.
- 27 Voegeli R, Schumacher W, Engel J, Respondek J, Hilgard P. D-19466, a new cyclobutane-platinum complex with antitumor activity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1990;116:439.
- 28 Lee WS, Lee GW, Kim HW, Lee OJ, Lee YJ, Ko GH, Lee JS, Jang JS, Ha WS. A phase II trial of haptaplatin/5-FU and leucovorin for advanced stomach cancer. *Cancer Research and Treatment* 2005;37:208.

-
- 29 Hanada K, Asano K, Nishimura T, Chimata T, Matsuo Y, Tsuchiya M, Ogata H. Use of a toxicity factor to explain differences in nephrotoxicity and myelosuppression among the platinum antitumour derivatives cisplatin, carboplatin and nedaplatin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2008;60:317.
 - 30 Guggenheim ER, Xu D, Zhang CX, Chang PV, Lippard SJ. Photoaffinity Isolation and Identification of Proteins in Cancer Cell Extracts that Bind to Platinum-Modified DNA. *ChemBioChem* 2009;10:141.
 - 31 Lippert B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. WILEY-VCH & Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999.
 - 32 Sttiroyens W, Dodion P, Rozenzweig M. Comparative effect of cisplatin, spiroplatin, carboplatin and iproplatin in a human tumor clonogenic assay. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1990;116:392.
 - 33 Dragovich T, Mendelson D, Kurtin S, Richardson K, Von Hoff D, Hoos A. A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2006;58:759.
 - 34 Cossa G, Gatti L, Zunino F, Perego P. Strategies to Improve the Efficacy of Platinum Compounds. *Current Medicinal Chemistry* 2009;16:2355.
 - 35 Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *British Journal of Cancer* 1993;67:1171.
 - 36 Miller SE, House DA. The hydrolysis products of cis-diamminedichloroplatinum(II) 5. The anation kinetics of cis-Pt(X)(NH₃)₂(OH)₂⁺ (XCl, OH) with glycine, monohydrogen malonate and chloride. *Inorganica Chimica Acta* 1991;187:125.
 - 37 Kostova I. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 2006;1:1.
 - 38 Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005;4:307.
 - 39 García-Ramos JC, Galindo-Murillo R, Cortés-Guzmán F, Ruiz-Azuara L. Metal-based drug-DNA interactions. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2013;57(3):245-59.
 - 40 Bogojeski J, Petrović B, Bugarčić ŽD. Interactions of the Platinum (II) Complexes with Nitrogen- and Sulfur-Bonding. *Bio-Molecules in Chronic Lymphocytic Leukemia* 2012;16:371.
 - 41 Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer* 1998;33:1522.
 - 42 Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *Journal of Nucleic Acids* 2010;2010:201367.
-

-
- 43 Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:787.
- 44 Wang K, Lu J, Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordination Chemistry Reviews* 1996;151:53.
- 45 Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin– DNA adducts. *Chemical Reviews* 1999;99:2467.
- 46 Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000;57:1299.
- 47 Reedijk J. The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds. *Inorganica Chimica Acta* 1992;198-200:873.
- 48 Sigel H, Sigel A. Metal ions in biological systems 1996;32:641-685.
- 49 Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *ChemComm* 1996;801.
- 50 Hambley TW. The influence of structure on the activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* 1997;166:181.
- 51 Appleton TG. Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with amino acids and related molecules. *Coordination Chemistry Reviews* 1997;166:313.
- 52 Bredel M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Bain Research Reviews* 2001;35:161-204.
- 53 Ishikawa T, Wright CD, Ishizuka H. GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:29085.
- 54 Romero-Canelo I, Sadler PJ. Next-generation metal anticancer complexes: multitargeting via redox modulation. *Inorganic Chemistry* 2013;52:12276.
- 55 Schilder RJ, Hall L, Monks A, Handel LM, Jr Fornace AJ, Ozols RF, Fojo AT, Hamilton TC. Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 1990;45:416.
- 56 Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 2000;65:95-106.
- 57 Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* 1993;268:20116.
- 58 Pérez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *European Journal of Cancer* 1998;34:1535.
-

-
- 59 Lempers ELM. Interactions of Platinum Amine Compounds with Sulfur-Containing Biomolecules and Dna Fragments. Reedijk J. *Advances in Inorganic Chemistry* 1991;37:175.
- 60 Esposito BP, Najjar R. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. *Coordination Chemistry Reviews* 2002;232:137.
- 61 Komeda S, Lutz M, Spek AL, Chikuma M, Reedijk J. New antitumor-active azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes: synthesis, characterization, crystal structures, and cytotoxic studies. *Inorganic Chemistry* 2000;39:4230.
- 62 Wheate NJ, Cullinane C, Webster LK, Collins JG. Synthesis, cytotoxicity, cell uptake and DNA interstrand cross-linking of 4,4'-dipyrazolymethane-linked multinuclear platinum anti-cancer complexes. *Anti-Cancer Drug Design* 2001;16:91.
- 63 Jansen BAJ, Van Der Zwan J, Den Dulk H, Brouwer J, Reedijk J. Dinuclear Alkyldiamine Platinum Antitumor Compounds: A Structure–Activity Relationship Study. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001;44: 245.
- 64 Komeda S, Lutz M, Spek AL, Yamanaka Y, Sato T, Chikuma M, Reedijk J. A Novel Isomerization on Interaction of Antitumor-Active Azole-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes with 9-Ethylguanine. Platinum(II) Atom Migration from N2 to N3 on 1,2,3-Triazole. *Journal of the American Chemical Society* 2002;124:4738.
- 65 Kasyanenko NA, Aia EEF, Bogdanov AA, Kosmotynsaya YV, Yakovlev KI. Complexes of DNA with trivalent metal ions in presence of manganese ions. *Molecular Biology* 2002;36:745.
- 66 Wheate NJ, Collins JG. Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* 2003;241:133.
- 67 Wheate NJ, Collins JG. Multi-nuclear platinum drugs: a new paradigm in chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 2005;5:267.
- 68 Komeda S, Kalayda GV, Lutz M, Spek AL, Yamanaka Y, Sato T, Chikuma M, Reedijk J. New Isomeric Azine-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes Circumvent Cross-Resistance to Cisplatin. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003;46:1210.
- 69 Kalayda GV, Komeda S, Ikeda K, Sato T, Chikuma M, Reedijk J. Synthesis, Structure, and Biological Activity of New Azine-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes – a New Class of Anticancer Compounds. *European Journal of Inorganic Chemistry* 2003;24:4347.
- 70 Kalayda GV, Jansen BAJ, Wielard P, Tanke HJ, Reedijk J. Dinuclear platinum anticancer complexes with fluorescent N,N'-bis(aminoalkyl)-1,4-diaminoanthraquinones: cellular processing in two cisplatin-resistant cell lines reflects the differences in their resistance profiles. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2005;10: 305.
-

-
- 71 Liu Q, Qu Y, Van Antwerpen R, Farrell N. Mechanism of the membrane interaction of polynuclear platinum anticancer agents. Implications for cellular uptake. *Biochemistry* 2006;45:4248.
- 72 Farrell N. *Metal Ions in Biological Systems* 2004;42:251.
- 73 Qu Y, Tran MC, Farrell NP. Structural consequences of a 3' → 3' DNA interstrand cross-link by a trinuclear platinum complex: unique formation of two such cross-links in a 10-mer duplex. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2009;14:969.
- 74 Billecke C, Finnis S, Tahash L, Miller C, Mikkelsen T, Farrell NP, Bögl O. Polynuclear platinum anticancer drugs are more potent than cisplatin and induce cell cycle arrest in glioma. *Neuro-Oncology* 2006;8:215.
- 75 Jodrell DJ, Evans TRJ, Steward W, Cameron D, Prendiville J, Aschele C, Noberasco C, Lind M, Carmichael J, Dobbs N, Gamboni G, Gatti B, De Braud F. Phase II studies of BBR3464, a novel tri-nuclear platinum complex, in patients with gastric or gastro-oesophageal adenocarcinoma. *European Journal of Cancer* 2004;40:1872.
- 76 Hegmans A, Kasparkova A, Vrana O, Kelland LR, Brabec V, Farrell NP. Amide-Based Prodrugs of Spermidine-Bridged Dinuclear Platinum. Synthesis, DNA Binding, and Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008;51:2254.
- 77 Montero EI, Benedetti BT, Mangrum JB, Oehlsen MJ, Qu Y, Farrell NP. Pre-association of polynuclear platinum anticancer agents on a protein, human serum albumin. Implications for drug design. *Dalton Transactions* 2007;36:4938.
- 78 Oehlsen ME, Qu Y, Farrell N. Reaction of Polynuclear Platinum Antitumor Compounds with Reduced Glutathione Studied by Multinuclear (^1H , ^1H - ^{15}N Gradient Heteronuclear Single-Quantum Coherence, and ^{195}Pt) NMR Spectroscopy. *Inorganic Chemistry* 2003;42:5498.
- 79 Zhou W, Almeqdadi M, Xifaras ME, Riddell IA, Yilmaz ÖH, Lippard SJ. The effect of geometric isomerism on the anticancer activity of the monofunctional platinum complex $\text{trans-[Pt(NH}_3)_2(\text{phenanthridine)Cl]NO}_3$. *Chemical communications* 2018;54(22):2788-2791.
- 80 Oehlsen ME, Hegmans A, Qu Y, Farrell N. Effects of geometric isomerism in dinuclear antitumor platinum complexes on their interactions with N-acetyl-L-methionine. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2005;10:433-442.
- 81 Williams JW, Qu Y, Bulluss GH, Alvorado E, Farrell NP. Dinuclear Platinum Complexes with Biological Relevance Based on the 1,2-Diamino-cyclohexane Carrier Ligand. *Inorganic Chemistry* 2007;46:5820.
- 82 Mao JF, Zhang YM, Zhu JH, Zhang CL, Guo ZJ. Molecular combo of photodynamic therapeutic agent silicon(IV) phthalocyanine and anticancer drug cisplatin. *Chemical Communications* 2009:908.
-

- 83 Cesar ET, De Almeida MV, Fontes APS, Maia ECP, Gamier-Suillerot A, Couri MRC, Felicio E.de CA. Synthesis, characterization, cytotoxic activity, and cellular accumulation of dinuclear platinum complexes derived from N,N'-di-(2-aminoethyl)-1,3-diamino-2-propanol, aryl substituted N-benzyl-1,4-butanediamines, and N-benzyl-1,6-hexanediamines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2003;95:297.
- 84 Teixeira LJ, Seabra M, Reis E, Da Cruz MTG, De Lima MCP, Pereira E, Miranda MA, Marques MPM. Cytotoxic Activity of Metal Complexes of Biogenic Polyamines: Polynuclear Platinum(II) Chelates. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47:2917.
- 85 Willermann M, Mulcahy C, Sigel RKO, Cerda MM, Freisinger E, Miguel PJS, Roitzsch M, Lippert B. Pyrazine as a building block for molecular architectures with PtII. *Inorganic Chemistry* 2006;45:2093.
- 86 LeRoy AF. Interactions of Platinum Metals and Their Complexes in Biological Systems. *Environmental Health Perspectives* 1975;10, 73–83..
- 87 Sharma R, Singh VJ, Chawla PA. Advancements in the Use of Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2022;22(5):821-835.
- 88 Komeda S, Bombard S, Perrier S, Reedijk J, Kozelk J. Kinetic study of azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes reacting with a hairpin-stabilized double-stranded oligonucleotide. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2003;96:357.
- 89 Teletchéa S, Komeda S, Teuben JM, Elizondo-Riojas MA, Reedijk J, Kozelka J. A Pyrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complex Induces Only Minor Distortions upon DNA-Binding. *Chemistry—A European Journal* 2006;12:3741.
- 90 Zhao YM, He WJ, Shi, PF, Zhu J H, Qiu L, Lin LP, Guo ZJ. A positively charged trinuclear 3N-chelated monofunctional platinum complex with high DNA affinity and potent cytotoxicity. *Dalton Transactions* 2006;22:2617.
- 91 Cheng H, Huq F, Beale P, Fisher K. Synthesis, characterisation, activities, cell uptake and DNA binding of a trinuclear complex: $[[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)]_2\mu\text{-}[\text{trans-Pd}(\text{NH}_3)(2\text{-hydroxypyridine})\text{-}(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)_2]\text{Cl}_4$. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006;41:896.
- 92 Huq F, Tayyem H, Yu JQ, Beale P, Fisher K. Activity of anovel trinuclear platinum complex: $[[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)]_2\mu\text{-}\{\text{trans-Pd}(3\text{-hydroxypyridine})_2(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)_2\}]\text{Cl}_4$ in ovariancancer cell lines. *ChemMedChem* 2008;10:145-151.
- 93 Huq F, Tayyem H, Yu JQ, Beale P and Fisher K: Synthesis, activity and binding with DNA of $[[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)]_2\mu\text{-}\{\text{trans-Pd}(4\text{-hydroxypyridine})_2(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)_2\}]\text{Cl}_4$ (TH8). *Medicinal Chemistry* 2009;5:372-381.
- 94 Hannon MJ. Supramolecular DNA recognition. *Chemical Society Reviews* 2007;36:280.

-
- 95 Harris AL, Ryan JJ, Farrell N. Biological Consequences of Trinuclear Platinum Complexes: Comparison of $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\mu\text{-(trans-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2)_2)]^{4+}$ (BBR 3464) with Its Noncovalent Congeners. *Molecular Pharmacology* 2006;69:666.
- 96 Harris AL, Yang X, Hegmans A, Povirk L, Ryan JJ, Kelland L, Farrell N. Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of a Novel Highly Charged Trinuclear Platinum Compound. Enhancement of Cellular Uptake with Charge. *Inorganic Chemistry* 2005;424:9598.
- 97 Gao E, Zhu M, Yin H, Liu L, Wu Q, Sun Y. Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity in vitro of dinuclear Pd(II) and Pt(II) complexes dibridged by 2,2'-azanediyldibenzoic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2008;102:1958.
- 98 Zhang JC, Ji XY, Wang LW, Li LW, Sun J, Zhang Y. Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of New Types of Binuclear Platinum(II) Complexes. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry* 2010;10:879-882.
- 99 Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation* 2005;12:1463-1467.
- 100 Guerra W, De Andrade Azevedo E, De Souza Monteiro AR, Becciarelli Rodriguz M, Chartone-Souza E, Amaral Nascimento AM, Soares Fontes AP, Le. Moyes I, Pereira-Maia EC. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005;99:2348.
- 101 Melino G. The Sirens' song. *Nature*. 2001;412(6842):23.
- 102 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972;26:239-257.
- 103 Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1995;5(1):21-26.
- 104 Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology* 2000;157(5):1415-1430.
- 105 Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284(33):21777-21781.
- 106 Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochemical Society Transactions* 2008;36(Pt 1):1-9.
- 107 Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* 2012;45(6):487-498
-

-
- 108 Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* 14(22):5579–88.
- 109 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;26(9):1324-1337.
- 110 Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2007;292(1):C45-51.
- 111 Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal of Cellular Biochemistry* 2014;115:632-640.
- 112 Yoshihide T, Shigeomi S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 2007;12:835-840.
- 113 Koshland DE. Molecule of the Year. *Science* 1993;262:1959.
- 114 Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science* 2003;116(Pt 20):4077-4085.
- 115 Hoe KK, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2014;13:217-236.
- 116 Cory S, Roberts A, Colman PM, Adams JM. Targeting BCL-2-like proteins to kill cancer cells. *Trends Cancer* 2016;2:443–460.
- 117 Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & Development* 2007;21(22):2861-2873.
- 118 Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of Cell Science* 2005;118(Pt 1):7-18.
- 119 Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 2008;4(4):510-512
- 120 Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36(12):2420-2434.
- 121 Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development* 2006;20(1):1-15.
- 122 Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death & Differentiation* 1999;6:931-933.
- 123 Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Letters* 2005;579(15):3287-3296.

-
- 124 Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews* 2007;87:99-163.
- 125 Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current Molecular Medicine* 2008;8:207-220.
- 126 Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* 2007;32:37-4.
- 127 Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1757:1371-1387.
- 128 Ohgoh M, Shimizu H, Ogura H, Nishizawa Y. Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 2000;75(3):925-933.
- 129 Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006;444:633-637.
- 130 Alimbetov D, Askarova S, Umbayev B, Davis T, Kipling D. Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19(6):1690.
- 131 Malhotra V, Perry MC. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biology & Therapy* 2003;2(4 Suppl 1):S2-4.
- 132 Kohn KW, Jackman J, O'Connor PM. Cell cycle control and cancer chemotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 1994;54(4):440-452.
- 133 Oronsky BT, Reid T, Knox SJ, Scicinski JJ. The Scarlet Letter of Alkylation: A Mini Review of Selective Alkylating Agents. *Translational Oncology*. 2012;5(4):226-229.
- 134 Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International* 2014;2014:150845.
- 135 Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2005;55(3):178-194.
- 136 Song T, Chang X, Zhang Z, Liu Y, Shen X. S1, a Novel Pan-BH3 Mimetic, Induces Apoptosis in Mcl-1-Overexpressing Cells Through Bak. *Journal of Pharmacological Sciences* 2012;119:330-340.
-

-
- 137 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002;3(6):401-410.
- 138 Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer* 2015;112:957-962.
- 139 Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307–315.
- 140 Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G. p53 and chemosensitivity. *Annals of Oncology* 1999;10:1011-1021.
- 141 Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, Wang K, Liu L, Chen Z, Meng Z. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Molecular Oncology* 2013;7(3):334-345.
- 142 Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, Hughes D, Kleinerman ES. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. *Cancer Research* 2012;72:908-916.
- 143 Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, Jiang X, He C, Hyjek E, Zhang J. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nature Communications* 2012;2:688.
- 144 Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* 2016;8(4):603-619.
- 145 Stephens L, Williams R, Hawkins P. Phosphoinositide 3-kinases as drugtargets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2005;5:357–365.
- 146 Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental Cell Research* 2001;264:29-41.
- 147 Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochemical Journal* 2004;382:1-11.
- 148 Bogdał MN, Hat B, Kochańczyk M et al. Levels of pro-apoptotic regulator Bad and anti-apoptotic regulator Bcl-xL determine the type of the apoptotic logic gate. *BMC Systems Biology* 2013;7:67.
- 149 De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer* 2006;6(1):24-37.
- 150 Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002; 3(11): 991-998.
- 151 Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117(5):1137-1146.
-

-
- 152 Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression. *Cancer Research* 2006; 66(11):5527-5536.
- 153 Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2018;1417(1):104-115.
- 154 Hanahan, D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21(3):309-322.
- 155 Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology* 2009;27:451-483.
- 156 Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002;23(11):549-555.
- 157 Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2009;86(5):1065-73.
- 158 Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 86(5):1105-1109.
- 159 Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *European Journal of Immunology* 2002; 32(2):1205-1211.
- 160 Vujanovic NL, Basse P, Herberman RB and Whiteside TL. Antitumor Functions of Natural Killer Cells and Control of Metastases. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1996;9:394-408.
- 161 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 2001;22(11):633-640.
- 162 Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Current Opinion in Immunology* 1995;7(5):704-710.
- 163 Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology* 2008;9(5):495-502.
- 164 Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 2009;126(4):449-457.
- 165 Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo A, Fremont D, Yokoyama W. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(13):8826-8831.

-
- 166 Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265(5171):528-530.
- 167 Kim P, Mahidhara R, Seol DW. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 2001;5:293-296,
- 168 Roda JM, Parihar R, Carson WE, III. CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. *Journal of Immunology* 2005;175(3):1619-1627.
- 169 Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 1995; 268(5212): 863-865.
- 170 Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH, Okusa MD. NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- γ Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Immunology* 2007;178(9):5899-5911.
- 171 Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology* 2007;25:297-336.
- 172 McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, Bossi G, Salio M, Denkberg G, Reddington F, Tarlton A, Reddy BG, Schmidt RR, Reiter Y, Griffiths GM, van der Merwe PA, Besra GS, Jones EY, Batista FD, Cerundolo V. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204(5):1131-1144.
- 173 Teng MWL, Westwood JA, Darcy PK, Sharkey J, Tsuji M, Franck RW, Porcelli SA, Besra GS, Takeda K, Yagita H, Kershaw MH, Smyth MJ. Combined natural killer T-cell based immunotherapy eradicates established tumors in mice. *Cancer Research* 2007;67(15):7495-7504.
- 174 Hayakawa Y, Rovero S, Forni G, Smyth MJ. A-galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(16):9464-9469.
- 175 Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Laboratory Investigation* 2006;86(3):231-245.
- 176 Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International Immunology* 2016;28(8):401-409.
- 177 Togashi Y, Nishikawa H. Regulatory T cells: molecular and cellular basis for immunoregulation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2017;410:3-27.
- 178 Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N. TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *Journal of Immunology* 2004;172(2):834-842.
-

-
- 179 Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of Immunology* 2004;172(8):4676-4680.
- 180 Abbas AK, Andrew H, Lichtman H, Pillai S. *Osnovna imunologija*. 2019.
- 181 Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *Journal of Immunology* 1999;163(9):4647-4650.
- 182 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461:1071-1078.
- 183 Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Research* 2003;63:1608-1614.
- 184 Wei EK, Colditz GA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Rosner BA. Cumulative risk of colon cancer up to age 70 years by risk factor status using data from the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology* 2009;170:863–872.
- 185 Power DG, Glogowski E, Lipkin SM. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2010;24:837–859.
- 186 Chen CD, Yen MF, Wang WM, et al.: A case-cohort study for the disease natural history of adenoma-carcinoma and de novo carcinoma and surveillance of colon and rectum after polypectomy: implication for efficacy of colonoscopy. *British Journal of Cancer* 2003;88(12):1866-73.
- 187 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: A Cancer Journal for Clinicians* 2021;71(3):209-249.
- 188 Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017;66(4):683-91.
- 189 Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *international Journal of Cancer* 2021.
- 190 Health Statistical Yearbook of Republic of Serbia 2010. Institute of Public Health of Serbia "Dr. Milan Jovanovic Batut". 2011. (On line).
- 191 Young PE, Womeldorph CM, Johnson EK, et al. Early Detection of Colorectal Cancer Recurrence in Patients Undergoing Surgery with Curative Intent: Current Status and Challenges. *Journal of Cancer* 2014;5(4):262-71
- 192 Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging* 2016;11:967-76.
-

-
- 193 Dahan L, Sadok A, Formento JL, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology* 2009;158(2):610-20.
- 194 Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: association of directors of anatomic and surgical pathology. *American Journal of Clinical Pathology* 2008;129(1):13–23.
- 195 Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tu-mours. 6th ed. New York WileyLiss. 2003.
- 196 Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference: colorectal working group. *Cancer* 2000;88(7):1739–57.
- 197 Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Heinemann V, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kühlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rödel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Zeitz M, Selbmann HK; Federal Committee of Physicians and Health Insurers.S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2010 ;48(1):65-136.
- 198 Chang GJ, Kaiser AM, Mills S, Rafferty JF, Buie WD; Standards Practice Task Force of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for the management of colon cancer. *Diseases of the Colon & Rectum* 2012;55(8):831-43
- 199 Tjandra JJ, Kilkenny JW, Buie WD, Hyman N, Simmang C, Anthony T, Orsay C, Church J, Otchy D, Cohen J, Place R, Denstman F, Rakinic J, Moore R, Whiteford M; Standards Practice Task Force; American Society of Colon and Rectal Surgeons.Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). *Diseases of the Colon & Rectum* 2005;48(3):411-23.
- 200 Tournigand C, André T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22:229-237
- 201 Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology* 2011;18(1):18–25.
- 202 Howells LM, Sale S, Sriramareddy SN, Irving GR, Jones DJ, Ottley CJ, Pearson DG, Mann CD, Manson MM, Berry DP, Gescher A, Steward WP, Brown K. Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer* 2011;129(2):476-86.
- 203 Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectalcancer. *The New England Journal of Medicine* 2006;355:1114-1123.
-

-
- 204 Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, Nordlinger B, Van de Velde CJ, Balmana J, Regula J, Nagtegaal ID, Beets-Tan RG, Arnold D, Ciardiello F, Hoff P, Kerr D, Köhne CH, Labianca R, Price T, Scheithauer W, Sobrero A, Taberero J, Aderka D, Barroso S, Bodoky G, Douillard JY, El Ghazaly H, Gallardo J, Garin A, Glynne-Jones R, Jordan K, Meshcheryakov A, Papamichail D, Pfeiffer P, Souglakos I, Turhal S, Cervantes A. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology* 2012; 23:2479-2516.
- 205 Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, et al. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Annals of Gastroenterology* 2016;29(1):18-23.
- 206 Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ et al. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2011;305(22):2335-42
- 207 Edge SB, Compton CC. The American joint Committete on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the of TNM. *Annals of Surgical Oncology* 2010;17(6):1471-4.
- 208 Haller DG, Taberero J, Maroun J, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil and Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(11):1465-71.
- 209 Sargent D, Sobrero A, Grothey A, et al. Evidence for cure by adjuvant therapy in colon cancer: observations based on individual patient data from 20,898 patients on 18 randomized trials. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:872-877.
- 210 Kritchenkov, AS, Stanishevskii YM, Skorik YA. Design and Antitumor Activity of Platinum Complexes. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2019;53:6–14.
- 211 Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Reviews* 2014;114(8):4540–63.
- 212 Farrer NJ, Sadler PJ. Medicinal Inorganic Chemistry: State of the Art, New Trends, and a Vision of the Future. In *Bioinorganic Medicinal Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011;1-47.
- 213 Dhar S, Lippard SJ. Medicinal Inorganic Chemistry: Current Status and Mechanism of Action of Platinum-Based Anticancer Drugs. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011;79-97.
- 214 Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N⁷-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl]²⁺; -modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Research* 1993;21(25):5846–5851.
- 215 Apps MG, Choi EHY, Wheate NJ. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocrine-related Cancer* 2015;22(4):219–233.
-

- 216 Zhang J, Wang L, Xing Z, Liu D, Sun J, Li X, Zhang Y. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2010;10: 272–282.
- 217 Senerović L, Živković MD, Veselinović A, Pavić A, Djuran MI, Rajković S, Nikodinović-Runić J. Synthesis and Evaluation of Series of Diazine-Bridged Dinuclear Platinum (II) Complexes through in Vitro Toxicity and Molecular Modeling: Correlation between Structure and Activity of Pt (II) Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015;58:1442–1451.
- 218 Ašanin DP, Živković MD, Rajković S, Warzajtis B, Rychlewska U, Djuran MI. Crystallographic evidence of anion... π interactions in the pyrazine bridged $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu-pz)\}Cl_2$ complex and comparative study of the catalytic ability of mononuclear and binuclear platinum (II) complexes in the hydrolysis of N-acetylated L-methionylglycine. *Polyhedron* 2013;51:255–262.
- 219 Rajković S, Ašanin DP, Živković MD, Djuran MI. Synthesis of different pyrazine-bridged platinum(II) complexes and 1H NMR study of their catalytic abilities in the hydrolysis of the N-acetylated L-methionylglycine. *Polyhedron* 2016;65:42–47.
- 220 Rajković S, Rychlewska U, Warzajtis B, Ašanin DP, Živković MD, Djuran MI. Disparate behavior of pyrazine and pyridazine platinum(II) dimers in the hydrolysis of histidine- and methionine-containing peptides and unique crystal structure of $\{[Pt(en)Cl]_2(\mu-pydz)\}Cl_2$ with a pair of NH...Cl...HN hydrogen bonds supporting the pyridazine bridge. *Polyhedron* 2014;67:279–285.
- 221 André T, De Gramont A, Vernerey D et al. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *Journal of Clinical Oncology* 2015; 33:4176-87.
- 222 Musio D, Cinquini M, Moschetti I, Fittipaldo VA, Aprile G, Beretta GD. Management of patients with early-stage colon cancer: guidelines of the Italian Medical Oncology Association. *ESMO Open* 2020;5(6):e001001.
- 223 Pachman DR, Ruddy K, Sangaralingham LR, Grothey A, Shah ND, Beutler AS, Hubbard JM, Loprinzi CL. Calcium and Magnesium Use for Oxaliplatin-Induced Neuropathy: A Case Study to Assess How Quickly Evidence Translates Into Practice. *Journal of National Comprehensive Cancer Network* 2015;13:1097-1101.
- 224 Milovanović M, Arsenijević N, Milovanović J, Živković MD. In vitro and in vivo activity of series of cationic dinuclearPt(II) complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2021;225:111619.
- 225 Bondžić AM, Žakula JJ, Korićanac LB, Keta OD, Janjić GV, Đorđević IS, Rajković SU. Cytotoxic activity and influence on acetylcholinesterase of series dinuclear platinum(II) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocyclic bridging ligands: Insights in the mechanisms of action. *Chemico-Biological Interactions* 2022;351:109708.

-
- 226 Rajković S, Živković MD, Djuran MI. Reactions of Dinuclear Platinum(II) Complexes with Peptides. *Current Protein & Peptide Science* 2016;17(2):95-105.
- 227 Franich AA, Đorđević IS, Živković MD, Rajković S, Janjić GV, Djuran MI. Dinuclear platinum(II) complexes as the pattern for phosphate backbone binding: a new perspective for recognition of binding modes to DNA. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2022;27(1):65-79.
- 228 Franich AA, Živković MD, Ilić-Tomić T, Đorđević IS, Nikodinović-Runić J, Pavić A, Janjić GV, Rajković S. New minor groove covering DNA binding mode of dinuclear Pt(II) complexes with various pyridine-linked bridging ligands and dual anticancer-antiangiogenic activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2020;25(3):395-409.
- 229 Ongoma PO. Tuning Reactivity of Platinum(II) Complexes: A Kinetic and Mechanistic Investigation Into Substitution Behaviour of Mono- and Dinuclear Platinum(II) Complexes, 2012.
- 230 Tsvetkova D, Ivanova S. Application of Approved Cisplatin Derivatives in Combination Therapy against Different Cancer Diseases. *Molecules*. 2022;27(8):2466.
- 231 Elmore S, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007;35:495-516.
- 232 Xu G., Gao C, Gou, S. and Cao Z. Synthesis, Cytotoxicity, Induction of Apoptosis, and Interaction with DNA of Dinuclear Platinum(II) Complexes. *ChemMedChem* 2012;7:2004-2009.
- 233 Bai J, Li Y, Zhang G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biology & Medicine* 2017;14:348-362.
- 234 Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Research* 2001;61:1029-1037.
- 235 Tyagi AK, Singh, RP, Agarwa IC, Chan DC, Agarwa IR. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clinical Cancer Research* 2002;8:3512-3519.
- 236 Wang Y, Bian L, Chakraborty T, Ghosh T, Chanda P, Roy S. Construing the Biochemical and Molecular Mechanism Underlying the In Vivo and In Vitro Chemotherapeutic Efficacy of Ruthenium-Baicalein Complex in Colon Cancer. *International Journal of Biological Sciences* 2019;15:1052-1071.
- 237 Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(12):2013-2019.
-

- 238 De Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2000;18(16):2938-2947.
- 239 Vietor NO, George BJ. Oxaliplatin-induced hepatocellular injury and ototoxicity: a review of the literature and report of unusual side effects of a commonly used chemotherapeutic agent. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 2012;18(3):355-359.

БИОГРАФИЈА

Дипломирани фармацеут Ивана Р. Васић је рођена 01. 05. 1979. године у Крагујевцу. Основну школу “Светозар Марковић” у Крагујевцу и Другу крагујевачку гимназију, општи смер, завршила је као Носилац Вукове дипломе и ђак генерације. Мастер студије фармације, смер дипломирани фармацеут, на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду уписала је школске 1998/99. године где је и дипломирала 2006. године. Докторске академске студије, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија, уписала је школске 2014/2015. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, где је у септембру 2016. године положила усмени докторски испит са оценом 9 (девет). Од школске 2016/2017. године до данас ангажована је као фацитатор на предмету Болничка фармацеутска пракса на Интегрисаним академским студијама фармације Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Од 2006. до 2011. године радила је као координатор за стационарне установе у оквиру Југохемија-Фармација д.о.о. Београд, чланице “DELTA HOLDING”. Од децембра 2011. године запослена је у Клиничком центру Крагујевац, где је до октобра 2019. године обављала функцију Начелника Службе за фармацеутску здравствену делатност-болничка апотека. Од децембра 2012. до децембра 2015. године обављала је и функцију Помоћника директора за јавне набавке лекова и санитетског потрошног материјала Клиничког центра Крагујевац. Успешно је завршила летњу школу менаџмента здравствених установа са темом “Систем интегрисане здравствене заштите-изазов за здравствени менаџмент” у организацији Европског центра за мир и развој Универзитета за мир Уједињених нација 2015. године. Члан је Европске асоцијације болничких фармацеута, као и удружења МЕНСА Србија од 2000. године. Говори течно енглески и познаје италијански језик.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

ЦИТОТОКСИЧНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ КАРЦИНОМА КОЛОНА МИЦА

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопствене 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, 14.02.2024.године,



потпис аутора

Образац 2

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

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

**ЦИТОТОКСИЧНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ КАРЦИНОМА КОЛОНА МИША**

истоветне.

У Крагујевцу, 14.02.2024.године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ивана Васић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

ЦИТОТОКСИЧНОСТ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ КАРЦИНОМА КОЛОНА МИША

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 наведену 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, дана 14.02.2024. 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/>