



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Кемал С. Ћоровић

**Синтеза, карактеризација и испитивање
биолошке активности комплекса
паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-
пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-
хидрокси-бензил)) сирћетне киселине**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Kemal S. Ćorović

**Synthesis, characterization, and
investigation of biological activity of
palladium(II) complexes with dialkyl esters
of (S,S)-propylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-
(4-hydroxy-benzyl)) acetic acid**

DOCTORAL DISSERTATION

Kragujevac, 2025

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор	
Име и презиме: Кемал Ћоровић	
Датум и место рођења: 23.02.1984. Нови Пазар	
Садашње запослење: вршилац дужности директора Дома здравља Тутин; доктор медицине, специјалиста опште хирургије.	
Докторска дисертација	
Наслов: Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине	
Број страница: 90	
Број фигура: 13	
Број табела: 7	
Број шема: 2	
Број библиографских података: 320	
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука	
Научна област (УДК): Медицина	
Ментори: др Данијела Стојковић , научна сарадница Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу за научну област Хемија др сци мед Бојан Стојановић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за научну област Хирургија	
Датум пријаве теме: 13.11.2023. године	
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-558/27 од 10.07.2024. године	

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Kemal Čorović
Date and place of birth: 23.02.1984. Novi Pazar
Current employment: Acting director of the Health Center Tutin; MD, General Surgeon.
Doctoral Dissertation
Title: Synthesis, characterization, and investigation of the biological activity of palladium(II) complexes with dialkyl esters of (<i>S,S</i>)-propane-1,2-diamine- <i>N,N'</i> -di-(2,2'-di-(4-hydroxybenzyl)) acetic acid
No. of pages: 90
No. of figures: 13
No. of tables: 7
No. of schemes: 2
No. of bibliographic data: 320
Institution and place of work: University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences
Scientific area (UDC): Medicine
Mentors: Danijela Stojković , PhD, Research Associate at the Institute for Information Technologies University of Kragujevac for the scientific field of Chemistry Bojan Stojanović , MD, PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac for the scientific field of Surgery
Topic Application Date: 13.11.2023.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-558/27 from 10.07.2024.

„Захвалан ум је велики ум, који ће једном привући велике ствари!“

- Платон

Желим изразити дубоку захвалност мојим менторима, научној сарадници др Данијели Стојковић и проф. др Бојану Стојановићу за њихово несебично вођење, подршку и стрпљење током мог истраживачког рада. Њихова стручност, савети и инспиративна посвећеност усмерили су ме кроз све изазове овог пута. Њихова подршка је била кључна не само за моје академско постигнуће, већ и за мој лични и професионални развој. Хвала вам што сте веровали у мене и пружили ми могућност да унапредим своје знање.

Посебно желим изразити неизмерну захвалност својој породици, а нарочито мојој деци Кериму и Илми, за безрезервну подршку, љубав и веру у мене током целог мог образовања. Њихова подршка је била моја највећа снага, посебно у тренуцима када су изазови деловали непремостиво. Свако њихово охрабрење и разумевање помогли су ми да останем усмерен и истрајан.

Хвала вам што сте увек били уз мене, што сте делили сваки мој успех и што сте веровали у мене до самог краја. Без вас, овај пут не би био могућ.

Такође, за мене и најемотивније је да овај рад посвећујем мом вољеном оцу, који је недавно напустио овај свет, али ће заувек живети у мом срцу и сећањима. Био је мој највећи ослонац, учитељ и инспирација, особа чији су љубав, посвећеност и неизмерна подршка обликовали сваки мој корак у животу. Његов константни оптимизам, вера у мене и снага којом се суочавао са свим животним изазовима остају ми као светионик и подстрек у свему што радим. Тата, твој дух живи у сваком делу овог рада, и свака реч исписана овде носи део твоје љубави и твоје вере у мене.

Хвала ти што си од мене направио ово што сам постао данас!

САЖЕТАК

Комплекси паладијум(II) представљају перспективну групу једињења са значајним потенцијалом за развој антитуморске и антимикробне терапије. У оквиру ове докторске дисертације синтетисана су четири диалкил естра (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине, означена као **L1-L4**, као и њихови одговарајући паладијум(II) комплекси (**C1-C4**), при чему је извршена њихова структурна карактеризација и испитивање биолошких активности. Резултати тестова цитотоксичне активности су показали да лиганд **L4** показује снажну цитотоксичност према туморским ћелијама, док комплекс **C4** испољава изражену селективност према неканцерогеним ћелијама. Поред тога, лиганд **L4** и комплекс **C4** су индуковали апоптозу у ћелијама карцинома дебелог црева (HCT116), што је потврђено повећаном експресијом активне каспазе-3, смањењем експресије антиапоптотског протеина Bcl-2, као и инхибицијом ћелијске пролиферације кроз редукцију експресије Ki-67 и заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази. Антимикробна испитивања показала су селективну и умерену активност синтетисаних једињења, при чему је интензитет дејства значајно варирао у зависности од врсте микроорганизама и типа једињења, што указује на специфичну селективност према одређеним патогенима. Ови резултати сугеришу да паладијум(II) комплекси и одговарајући лиганди имају обећавајуће особине у терапији малигних обољења. Међутим, даља истраживања су неопходна како би се у потпуности разумели механизми њиховог дејства, побољшала терапијска ефикасност и одредила безбедна доза пре потенцијалне клиничке примене.

Кључне речи: комплекси паладијума; диалкил естри; цитотоксична активност; колоректални карцином; карцином дојке; антимикробна активност

ABSTRACT

Palladium(II) complexes represent a promising group of compounds with significant potential for the development of antitumor and antimicrobial therapies. In this study, four dialkyl esters of (S,S)-propylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzyl)) acetic acid, marked as **L1-L4**, and their corresponding palladium(II) complexes (**C1-C4**) were synthesized, and a detailed analysis of their structural properties and biological activities was conducted. The evaluation of cytotoxic activity revealed that ligand **L4** exhibits strong cytotoxicity toward tumor cells, while complex **C4** demonstrates marked selectivity toward non-cancerous cells. Furthermore, ligand **L4** and complex **C4** induced apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells, as evidenced by increased expression of active caspase-3, decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2, inhibition of cell proliferation through reduced Ki-67 expression, and cell cycle arrest in the G0/G1 phase. Antimicrobial testing showed selective and moderate activity of the synthesized compounds, with the intensity of action significantly varying depending on the type of microorganism and compound, suggesting specific selectivity toward certain pathogens. These findings suggest that palladium(II) complexes and their corresponding ligands hold promising properties for use in malignancy treatment. However, further research is essential to fully understand their mechanisms of action, improve therapeutic efficacy, and assess the safety profile before potential clinical application.

Keywords: palladium(II) complexes; dialkyl esters; cytotoxic activity; colorectal cancer; breast cancer; antimicrobial activity

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Колоректални карцином	2
1.1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома	2
1.1.2. Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома	3
1.1.3. Етиопатогенеза и генетски механизми настанка колоректалног карцинома	4
1.1.3.1. Гени укључени у настанак колоректалног карцином	4
1.1.3.2. Пuteви настанка колоректалног карцинома	5
1.1.3.3. Фамилијарни и наследни синдроми	6
1.1.3.4. Аденом-карцином секвенца	6
1.1.4. Клиничка слика, дијагноза и превенција колоректалног карцинома	7
1.1.4.1. Клиничка слика	7
1.1.4.2. Методе дијагнозе	7
1.1.4.3. Лабораторијске и патохистолошке анализе	7
1.1.4.4. Класификација и стадијум	8
1.1.4.5. Превенција и скрининг колоректалног карцинома	8
1.1.5. Терапијски модалитети у лечењу колоректалног карцинома	8
1.1.5.1. Хируршко лечење	9
1.1.5.2. Радиотерапија	10
1.1.5.3. Хемиотерапија	10
1.1.5.4. Биолошка терапија	11
1.1.5.5. Имунотерапија колоректалног карцинома	11
1.2. Карцином дојке	12
1.2.1. Епидемиолошке карактеристике карцинома дојке	12
1.2.2. Фактори ризика за настанак карцинома дојке	13
1.2.2.1. Модификујући фактори ризика	13
1.2.2.2. Немодификујући фактори ризика	14
1.2.2.3. Заштитни фактори	14
1.2.3. Класификација, типови и туморигенеза карцинома дојке	15
1.2.3.1. Класификација карцинома дојке	15
1.2.3.2. Молекулски подтипови карцинома дојке	15
1.2.3.3. Сигнални путеви значајни за настанак карцинома дојке	15
1.2.3.4. Генетска основа карцинома дојке	17
1.2.4. Клиничка слика, дијагноза и скрининг карцинома дојке	17
1.2.4.1. Клиничка слика карцинома дојке	17
1.2.4.2. Дијагноза карцинома дојке	17

1.2.4.3. Скрининг карцинома дојке	18
1.2.5. Лечење карцинома дојке	18
1.2.5.1. Хируршки третман	18
1.2.5.2. Радиотерапија карцинома дојке	19
1.2.5.3. Хемиотерапија и хормонска терапија карцинома дојке.....	20
1.2.5.4. Циљана терапија карцинома дојке	21
1.2.5.5. Имунотерапија карцинома дојке	22
1.3. Примена комплекса прелазних метала у онкологији	23
1.3.1. Металотерапија	23
1.3.2. Антитуморска својства цисплатине	24
1.3.3. Антитуморска својства паладијума (Pd)	24
1.4. Комплекси прелазних метала као антимикуробни агенси	25
1.5. Деривати етилендиамин и пропилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетата.....	26
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	29
2.1. Циљ истраживања.....	30
2.2. Радне хипотезе истраживања.....	31
3.1. Хемикалије и инструменти	33
3.2. Синтеза лиганата (L1-L4).....	33
3.3. Синтеза комплекса (C1-C4).....	36
3.4. Интеракције са биолошки значајним молекулама.....	38
3.4.1. Интеракције са хуманим серумом албумина (ХСА).....	38
3.4.2. Интеракције са ДНК.....	38
3.4.3. Мерење вискозности	39
3.5. Евалуација цитотоксичне активности	39
3.5.1. Ћелијске линије хуманог и мишијег порекла	39
3.5.2. Тест цитотоксичности	39
3.6. Анализа апоптотског одговора	40
3.7. Испитивање утицаја на динамику ћелијског циклуса	40
3.8. Испитивање антимикуробне активности.....	41
3.8.1. Референтни сојеви коришћени у истраживању	41
3.8.2. Припрема суспензије.....	41
3.8.3. Микродилуциона метода	41
3.9. Статистичка обрада података	42
4.2. Анализа везивања за ХСА.....	44
4.2.1. Испитивање интеракције паладијум(II) комплекса са ХСА флуоресцентном спектроскопијом.....	45
4.3. Студије интеракције синтетисаних комплекса са ДНК	46

4.3.1. Испитивање интеракција паладијум(II) комплекса са ДНК флуоресцентном спектроскопијом.....	46
4.4. Вискозитет.....	48
4.5. Процена цитотоксичних ефеката синтетисаних лиганада и паладијум(II) комплекса на ћелије карцинома помоћу МТТ теста	48
4.5.1. Испитивање цитотоксичног дејства L4 лиганда и C4 комплекса.....	49
4.6. Процена механизма антитуморске активности комплекса C4 и лиганда L4 на ћелијама хуманог колоректалног карцинома (HCT116) <i>in vitro</i>	51
4.6.1. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганд на процентуалну заступљеност HCT116 ћелија у раној али и касној фази апоптозе.....	51
4.6.2. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на процентуалну заступљеност каспаза 3 + HCT 116 ћелија и смањују проценат Bcl-2 + HCT116 ћелија	53
4.6.3. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на проценат Ki-67 ⁺ HCT116 ћелија и заустављају ћелијски циклус у G0/G1 фази	54
4.6.4. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на процентуалну заступљеност циклин D3 + HCT 116 ћелија.....	56
4.7. Испитивање антимикробне активности.....	56
5.2. Карактеризација новосинтетисаних лиганада и комплекса и испитивање интеракција са биолошки важним молекулима	60
5.3. Антитуморски потенцијал лиганада L1-L4 и комплекса C1-C4 <i>in vitro</i>	60
5.3.1. Утицај комплекса C4 и лиганда L4 на вијабилност туморских ћелија.....	60
5.3.2. Утицај C4 комплекса и L4 лиганда на апоптотску смрт туморских ћелија	62
5.3.3. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на пролиферацију ћелија хуманог колоректалног карцинома	64
5.4. Испитивање антимикробне активности лиганада L1-L4 и комплекса C1-C4	66
7. ЛИТЕРАТУРА.....	70

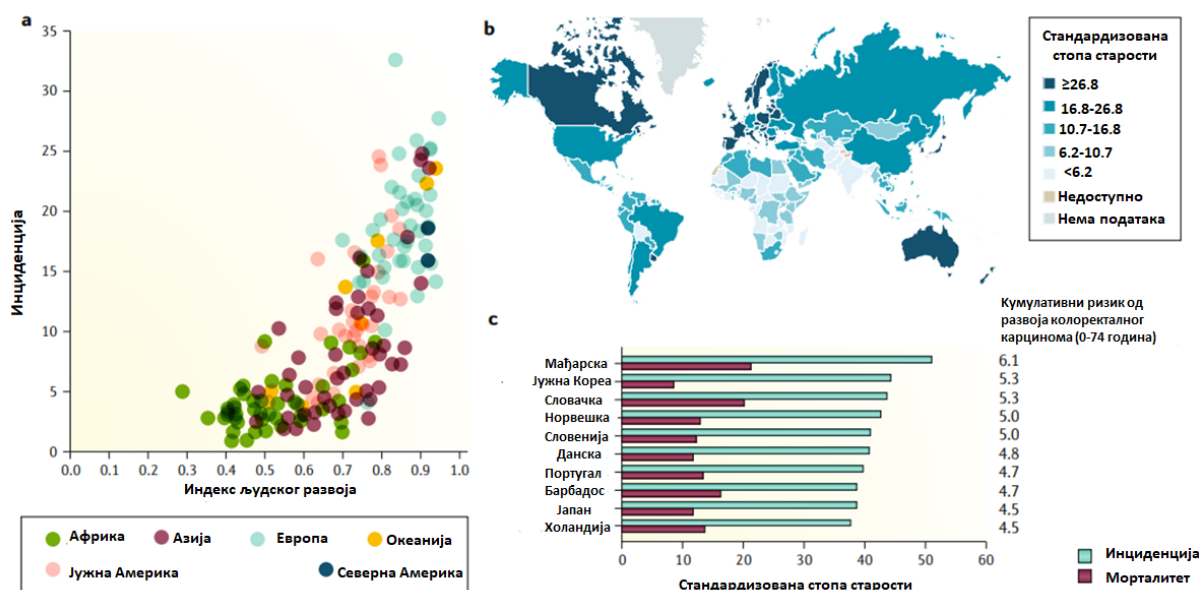
1. УВОД

1.1. Колоректални карцином

Колоректални карцином представља најчешћи примарни малигни тумор који захвата гастроинтестинални тракт. Терминолошки се односи на неоплазме дебелог црева и ректума. Због ембриолошких, хистопатолошких и анатомских карактеристика, као и специфичне етиопатогенезе, овај тумор се класификује у три групе: карцином десностраничног колона (проксималног), левостраничног колона и ректума (дисталног). Ова подела има значајан утицај на приступ лечењу и прогнозу болести (1).

1.1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома

Према извештају Међународне агенције за истраживање карцинома (*Globocan*) из 2022. године забележено је скоро 20 милиона нових случајева обољевања од колоректалног карцинома и 9,7 милиона смртних исхода, при чему рак плућа остаје најчешће дијагностикован (12,4%) и водећи узрок смртности (18,7%). Карцином колоректума је био трећи најчешћи рак у свету са 9,6% нових случајева и други водећи узрок смртности са 9,3% смртних исхода. Учесталост карцинома варира од преко 500 случајева на 100.000 у Аустралији и Новом Зеланду до испод 100 у Западној Африци код мушкараца, док код жена варира од преко 400 случајева на 100.000 до око 100 у истим регијама (Фигура 1). Предвиђања указују да ће број нових случајева достићи 35 милиона до 2050. године, што чини превенцију кључном за смањење будућих дијагноза и побољшање здравља на глобалном нивоу (2). Учесталост карцинома колоректума је већа код мушкараца него код жена. Млађе жене (узраста 18–44 године) са колоректалним карциномом показују боље преживљавање у поређењу са мушкарцима исте старосне групе или са старијим женама (преко 50 година), што указује на глобалну разлику у стопама инциденце и преживљавања између полова код колоректалног карцинома (3). Колоректални карцином је други водећи узрок смртности од рака у Сједињеним Америчким Државама, са значајним варијацијама у инциденци и смртности по старосним и етничким групама. Док инциденца и смртност опадају код старијих од 65 година, стопе расту код особа млађих од 50 година, нарочито међу не-хиспано белцима (4). Према подацима које је 2021. године објавио Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“, колоректални карцином је новооткривен код 5174 пацијента, од којих је 2029 жена и 3145 мушкараца. Овај број представља 12,4% укупног броја новодијагностикованих малигнитета у Србији, чиме је колоректални карцином рангиран као други најзначајнији узрок обољевања и смртности од рака. Значај овог карцинома у епидемиолошком смислу потврђује и његова висока учесталост међу оба пола, при чему је стопа инциденце већа код мушкараца. Ови подаци указују на потребу за интензивирањем скрининг програма, превентивних мера и побољшања приступа раној дијагнози и терапији, са циљем смањења терета који ова болест носи у здравственом систему Србије (5).



Фигура 1. Епидемиологија колоректалног карцинома. Преузето и кориговано у складу са: <https://www.nature.com/articles/s41575-019-0189-8>

1.1.2. Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома

Фактори ризика за развој колоректалног карцинома могу се категорисати на непроменљиве и оне подложне превенцији. Непроменљиви фактори укључују: старост преко 50 година, пол, расу, личну и породичну анамнезу за полипозу или карцином, присуство инфламацијских болести црева (улцерозни колитис, Крнова болест), наследне синдроме као што су породична аденоматозна полипоза и наследни неполипозни колоректални карцином, као и одређене медицинске интервенције, попут зрачења или холецистектомије (6, 7).

Фактори ризика подложни превенцији обухватају: исхрану, гојазност, физичку неактивност, дијабетес и инсулинску резистенцију, пушење цигарета и конзумирање алкохола (8). Старење је доминантан ризични фактор, са преко две трећине дијагностикованих случајева колоректалног карцинома који се јављају код особа старијих од 50 година (9). Значајан фактор ризика за развој колоректалних неоплазми представља породична анамнеза колоректалног карцинома. Код приближно 20% пацијената са аденоматозним полипима или колоректалним карциномом утврђено је постојање породичног оптерећења овим неоплазмама, док је код око 55% случајева колоректалног карцинома идентификован наслеђени генетски поремећај (10).

Фактори животне средине и исхране играју кључну улогу. Исхрана са ниским уносом влакана, богатим црвеним месом и неуравнотеженим омега-3 и омега-6 мастима повећава ризик од карцинома, док висок унос воћа и поврћа смањује овај ризик. Кључни заштитни елементи у исхрани укључују селен, фолну киселину, витамине Б12 и Д, хлорофил, каротеноиде и интравенски аскорбинску киселину, уз додатак дигестивних ензима и пробиотика (11). Употреба аспирина и других нестероидних антиинфламацијских лекова (енгл. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) такође може смањити ризик од карцинома због њиховог антиинфламацијског дејства (12). Алкохол, гојазност и седентарни начин живота с друге стране повећава ризик, док физичка активност, одржавање здраве телесне масе, промена исхране и начина живота доприносе превенцији настанка колоректалног карцинома (6, 7, 13). Инфламацијска

болест црева је значајан фактор ризика, при чему трајање и обим упале корелирају са ризиком од карциногенезе (14). Зрачење посебно повећава ризик од колоректалног карцинома, али остаје нејасно да ли је то директан ефекат зрачења или последица претходног карцинома у карличној регији, као на пример код пацијената који се лече зрачењем због карцинома простате, где ризик од колоректалног карцинома значајно расте (15). Такође, жене које користе у менопаузи хормоне имају мањи ризик да оболе од колоректалног карцинома од жена које исте хормоне не користе (16). Из свега наведеног, уочава се да је препознавање свих ових фактора ризика од кључног значаја за увођење ефикасних програма скрининга и превенције у циљаним популацијама.

1.1.3. Етиопатогенеза и генетски механизми настанка колоректалног карцинома

Колоректални карцином је резултат интеракције генетских фактора и фактора спољашње средине. Облици болести укључују: спорадичну болест: која се најчешће јавља код особа старијих од 50 година живота и чини 70% свих случајева рака дебелог црева; породичну болест: која се јавља у породицама и за разлику од наследног облика болести, код ове врсте болести нема откривене генетске предиспозиције. Око 20-25% случајева припада овој групи; наследну болест: која се јавља код мање од 10% свих пацијената са колоректалним карциномом (17, 18). Разумевање генетских и молекулских механизма који подупиру развој ове болести од кључног је значаја за рану дијагностику и терапију. Наиме, колоректални карцином најчешће настаје из аденоматозних полипа, акумулацијом мутација у оквиру аденом-карцином секвенце. Кључни гени укључени у овај процес су: APC (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli*), K-Ras (енгл. *Kirsten rat sarcoma virus*), p53 (енгл. *Tumor protein p53*), и PTEN (енгл. *Phosphatase and tensin homolog*) (17, 18).

1.1.3.1. Гени укључени у настанак колоректалног карцинома

APC ген је тумор-супресорски ген, који је први пут описан код пацијената са породичном аденоматозном полипозом. Мутације у оба алела APC гена неопходне су за формирање полипа, а његова инактивација није сама довољна за настанак карцинома, већ ствара основу за даље генетске промене које потом доводе до малигнитета. Зато и познавање специфичне мутације у породици може много да помогне за касније доношење клиничких одлука (19). Треба истаћи, да за разлику од мутација APC гена, које се наслеђују аутомомно доминантно, да на пример биалелијска мутација у MUTYH гену (енгл. *mutY DNA glycosylase homolog*) доводи до аутозомно рецесивног обрасца наслеђивања (20, 21).

K-Ras ген је протоонкоген где је довољна мутација његовог само једног алела да се поремети ћелијски циклус. Често је мутиран у овим туморима, што резултира неконтролисаној сигнализацијом и растом ћелија. Наиме, производ K-Ras гена је G-протеин (енгл. *Guanine nucleotide-binding protein*) који је укључен у унутар ћелијску сигналну трансдукцију. Када је он активан, K-Ras веже гуанозин-5'-трифосфат (енгл. *Guanosine-5'-triphosphate*, GTP), чија даља хидролиза доводи до гуанозин дифосфата (енгл. *Guanosine diphosphate*, GDP) који инактивира G-протеин. Међутим, управо мутација K-Ras гена резултује немогућношћу хидролизе GTP-а, што оставља G-протеин стално у његовом активном облику, па се сматра да управо то доводи до неконтролисане деобе ћелија. Зато што мутација K-Ras доводи до неконтролисаног сигнализирања, анти-EGFR (енгл. *Epidermal growth factor receptor*) агенси су неефикасни у лечењу тумора са мутацијом K-Ras. Сходно томе, статус мутације K-Ras је важан у одлучивању када

уопште користити анти- EGFR терапију. Из свега се закључује да мутације у K-Ras гену чине туморе отпорним на анти- EGFR терапију (22).

P53 ген је тумор-супресорски ген, објашњен је у многим малигнитетима, и он је кључан за иницијацију апоптозе у ћелијама са непоправљивим генетским оштећењима. Његове мутације су присутне у 43% случајева колоректалног карцинома (23).

PTEN је тумор супресорски ген, који је укључен у сигнализацију и контролу раста, а такође је честа и његова делеција, посебно у синдромима полипозе као што су: јувенилна полипоза, *Peutz-Jeghers* синдром, *Cowdenovog* синдром, PTEN хамартоматозни синдром, као и код мултипле ендокрине неоплазије тип IIБ (24).

1.1.3.2. Пuteви настанка колоректалног карцинома

Колоректални карцином настаје кроз три главна генетска пута: пут хромозомске нестабилности (енгл. *Chromosomal instability pathway*, CIN), пут микросателитске нестабилности (енгл. *Microsatellite instability pathway*, MSI) и метилациони фенотип CpG острваца (енгл. *CpG island methylation pathway*, CIMP), који обухватају различите генетске и епигенетске механизме (25).

CIN је одговоран за 70-85% колоректалних карцинома и карактерише га акумулација хромозомских аберација, попут мутација у APC и KRAS генима, губитка хромозома 5q, 18q и 17p, који садрже кључне гене попут TP53. Рани маркер овог пута је диспластични фокус, који претходи развоју аденома и аденокарцинома. Мутације у APC гену играју централну улогу у супресији Wnt сигналног пута и одржавању ћелијске стабилности, док KRAS мутације активирају RAS-RAF-MEK-ERK сигнални пут, повећавајући ризик од напредовања лезија. TP53 абнормалности, које се јављају у касним фазама, ометају ћелијски циклус и апоптозу, што доприноси малигној прогресији. CIN пут служи као основа за молекуларну класификацију колоректалног карцинома, иако је јасно да могу постојати и други механизми његовог развоја (25, 26).

MSI настаје као резултат дисфункције система за поправку неправилног упаривања (енгл. *mismatch repair*, MMR), што доводи до нестабилности у бројевима понављања у микросателитским регионима ДНК тумора у поређењу са герминалном ДНК. Карциноми који показују значајну микросателитну нестабилност, повезани су са мутацијама у MMR генима као што су MLH1 (енгл. *MutL Homolog 1*), MSH2 (енгл. *MutS Homolog 2*), MSH6 (енгл. *MutS Homolog 6*) и PMS2 (енгл. *Postmeiotic Segregation 2*), или са метилацијом промотора MLH1 у спорадичним случајевима, често у оквиру CIMP пута. Ови тумори, без обзира на наслеђени или спорадични контекст, деле сличну биологију и доприносе повећаној учесталости генетских грешака у генима повезаним са карциногенезом колоректалног карцинома (25).

CIMP пут је други најчешћи механизам спорадичног колоректалног карцинома, чинећи око 15% случајева, и одликује се епигенетском нестабилношћу која доводи до метилације промоторских региона кључних тумор-супресорских гена као што је MLH1. CIMP-позитивни карциноми имају специфичне клиничко-патолошке карактеристике, укључујући проксималну локализацију, предоминантну појаву код старијих жена и повезаност са мутацијама у BRAF (енгл. *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) или ређе KRAS гену, зависно од подтипа CIMP-а (25, 27).

Иако су ови путеви независни, могу се преклапати. На пример, у CIMP путу, метилација гена за поправку ДНК може омогућити накупљање мутација из MSI пута. Ова сложена интеракција указује на хетерогеност колоректалног карцинома. Текућа истраживања настоје да идентификују специфичне молекуларне мете за развој циљаних терапија и молекуларно профилисање тумора, што би могло унапредити персонализовани приступ у лечењу (25).

1.1.3.3. Фамилијарни и наследни синдроми

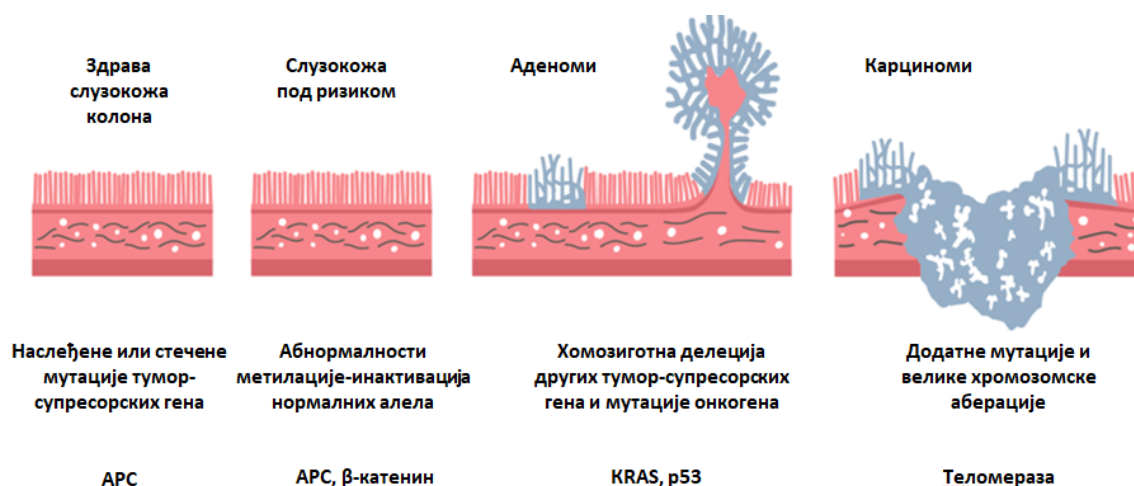
Фамилијарна аденоматозна полипоза (енгл. *Familial adenomatous polyposis*, FAP) је ретко генетско обољење аутозомно доминантног наслеђивања, које се карактерише бројним аденоматозним полипима који неизбежно напредују у колоректални карцином ако се не открију и не лече рано. Преко 70% пацијената развија екстраинтестиналне манифестације, укључујући остеоми, зубне аномалије и друге лезије, које су раније подвођене под *Gardner* и *Turcot* синдром или гастрични аденокарцином са проксималном полипозом желуца. Недавна истраживања указују на повезаност тежине болести са специфичним мутацијама у APC гену (28).

Ослабљена фамилијарна аденоматозна полипоза (енгл. *Attenuated Familial Adenomatous Polyposis*, AFAP) је фенотипска варијанта фамилијарне аденоматозне полипозе, карактерише се присуством 10-99 синхроних аденома у дебелом цреву, са блажим фенотипом, каснијим настанком аденома и рака, и ређим екстраколонијалним манифестацијама. У мање од 50% случајева је узрокована мутацијама у APC или MUTYH гену, са различитим механизмима наслеђивања, а надзор укључује редовне колоноскопије и хируршки третман у напредним случајевима (29).

Наследни неполипозни колоректални карцином (енгл. *Hereditary nonpolyposis colon cancer*, HNPCC) или *Lynch* синдром: чини 1-3% случајева и обележен је раним почетком карцинома и честом асоцијацијом са другим врстама малигнитета, попут ендометријалног карцинома (30).

1.1.3.4. Аденом-карцином секвенца

Већина колоректалних тумора потиче из преканцерозних полипа, који се првенствено класификују као традиционални тубуларни аденоми или назубљени полипи. Аденоми настају када се поремете механизми који регулишу поправку ДНК и пролиферацију ћелија. У нормалној интестиналној мукози, епител се континуирано обнавља како би се надокнадио губитак ћелија са површине, при чему је пролиферација ограничена на базу крипте. Међутим, током развоја аденома, мутантне ћелије одступају од уобичајених процеса терминалне диференцијације и апоптозе док мигрирају према лумену колона, што доводи до формирања специфичних аденоматозних структура. Временом, ови полипи се увећавају, показују све већи степен дисплазије и могу стећи потенцијал за инвазију околних ткива (31). Прелазак са нормалног епитела на хиперпролиферативно ткиво следи корак-по-корак процес генетских промена у кључним регулаторним генима, што пружа парадигму за развој солидних тумора. Мутације у гену APC, који делује као тумор супресор, или у онкогену BRAF, представљају кључне иницијалне догађаје који доводе до настанка традиционалних аденома или назубљених полипа (Фигура 2). Додатне генетске промене омогућавају напредовање од ране неоплазије до средњих и напредних полипа са високостепеном дисплазијом, а на крају и до инвазивног карцинома (32). Међутим, нису сви аденоми предодређени да се развију у малигне туморе; за прогресију у малигнитет неопходно је акумулирање специфичних мутација у одређеном редоследу. Временски оквир за прогресију тумора варира у зависности од основног пута туморогенезе. На пример, развој тумора преко CIN пута хромозомске нестабилности може трајати више од деценије, док пут MSI доводи до бржег формирања тумора, често у року од неколико година (33).



Фигура 2. Аденом-карцином секвенца колоректалног карцинома. Преузето и кориговано у складу са: <https://www.lecturio.com/concepts/colorectal-cancer/>

1.1.4. Клиничка слика, дијагноза и превенција колоректалног карцинома

1.1.4.1. Клиничка слика

Колоректални карцином често има асимптоматски почетак, а симптоми попут промене у навикама цревног пражњења, надимања, ректалног крварења и бола у стомаку обично се јављају у каснијим фазама болести. Напреднији стадијуми могу бити праћени значајним губитком телесне тежине, анемијом и симптомима метастатске болести. Такође, бол, тенезме и крварење се могу јавити код тумора ректума. У односу на цревни промер и конзистенцију саме столице, тумори који су лоцирани на левом колону склонији су да изазову опструкције у односу на туморе који су лоцирани на десној страни колона. Дијагноза се обично поставља у узрапредовалим фазама због неспецифичности раних симптома (34). Преоперативни ниво СЕА (енгл. *Carcinoembryonic Antigen*) сугерисан је као прогностички индикатор (35).

1.1.4.2. Методе дијагнозе

Дијагностички процес почиње детаљном анамнезом, клиничким прегледом и дигиторекталним прегледом (34). Ендоскопске методе, као што су колоноскопија и ректоскопија, представљају златни стандард за рано откривање и биопсију тумора (36). Имиџинг методе, попут компјутеризоване томографије (енгл. *Computed tomography*, CT) и магнетне резонанце (енгл. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI), користе се за процену локалног проширења тумора и детекцију метастаза (37, 38). Допунске методе укључују ултрасонографију абдомена и ендоректални ултразвук. Када је у питању карцином ректума, у дијагностици и предвиђању даљих поступака лечења предност ипак има MRI (38).

1.1.4.3. Лабораторијске и патохистолошке анализе

Лабораторијске анализе укључују мерење нивоа карциноембрионалног антигена, СЕА који има дијагностички и прогностички значај, јер његов висок ниво повезан је са лошом прогнозом исхода колоректалног карцинома (35). Патохистолошка анализа оперативног или биоптичког материјала је кључна за потврду дијагнозе и процену туморских

карактеристика, укључујући тип, градус, степен инвазије и захваћеност лимфних чворова (39, 40).

1.1.4.4. Класификација и стадијум

Тумори се класификују на основу степена диференцијације и броја кластера слабо диференцованих ћелија, док се стадијум одређује према TNM (енгл. *Tumour, Node, Metastasis*) систему. Ова класификација омогућава прецизно планирање терапије и процену прогнозе (41).

1.1.4.5. Превенција и скрининг колоректалног карцинома

Примарна превенција колоректалног карцинома укључује смањење ризичних фактора као што су пушење, гојазност, физичка неактивност и прекомерна конзумација црвеног меса, као и промоцију заштитних мера попут исхране богате влакнима, витаминима Д и Ц, фолата и редовне физичке активности (6, 7, 11, 13). Секундарна превенција обухвата рано откривање путем скрининга. Колоноскопија, као златни стандард, омогућава детекцију и уклањање аденоматозних полипа, што значајно смањује ризик од развоја карцинома. Скрининг је посебно препоручен за особе са повећаним ризиком, укључујући оне са породичном историјом, инфламаторним болестима црева или претходним полипима (42, 43). Методе скрининга укључују: Фекални тест на окултно крварење (енгл. *Fecal occult blood test*, FOBT) и фекални имунохемијски тест (енгл. *Fecal immunochemical test*, FIT), који се препоручују за годишње тестирање и ДНК тест столице, који је осетљивији, али мање специфичан, са препоруком за извођење сваких 1-3 године, док NCCN (енгл. *National Comprehensive Cancer Network®*, NCCN®) водичи подржавају коришћење на сваке 3 године (42, 43). Ендоскопске методе, попут колоноскопије, остају најпоузданије, док флексибилна сигмоидоскопија и СТ колоноскопија представљају алтернативне опције у одређеним случајевима. Препоруке за скрининг обухватају годишњи FOBT/FIT, флексибилну сигмоидоскопију на сваких 5 година или колоноскопију на сваких 10 година. Пацијенти са повећаним ризиком захтевају ранији и чешћи скрининг. Овај мултимодални приступ доприноси смањењу морбидитета и морталитета, омогућавајући рано откривање и успешнију терапију колоректалног карцинома (42-46).

1.1.5. Терапијски модалитети у лечењу колоректалног карцинома

Колоректални карцином представља значајан клинички изазов у онкологији, захтевајући мултидисциплинарни приступ који укључује разноврсне терапијске опције. Ове опције обухватају ендоскопске и хируршке процедуре, као и савремене минимално инвазивне технике попут лапароскопске и роботске хирургије (47). Поред хируршког лечења, хемотерапија представља кључну компоненту у адјувантној и неoadјувантној терапији, смањујући ризик од рецидива и побољшавајући прогнозу пацијената. Увођење циљаних терапија значајно је побољшало преживљавање код пацијената са узнапредовалим стадијумима болести. Имунотерапија показује обећавајуће резултате, посебно код пацијената са микросателитном нестабилношћу. Радиотерапија је незаменљив део лечења карцинома ректума, где се често комбинује са хемотерапијом ради смањења величине тумора пре хируршког захвата (48).

Синергијом ових различитих приступа омогућава се персонализовани третман, који је усмерен ка побољшању исхода и квалитета живота пацијената са колоректалним карциномом. Наставак истраживања у области онкологије доприноси даљем унапређењу ових терапијских модалитета.

1.1.5.1. Хируршко лечење

Ендоскопске методе, попут колоноскопске ресекције, представљају ефикасан и минимално инвазиван приступ у лечењу раног колоректалног карцинома, укључујући карциноме „*in situ*“. Ове процедуре постале су учесталије захваљујући скрининг програмима који омогућавају рану детекцију. Успешност лечења зависи од прецизне процене дубине инвазије тумора, степена његове диференцијације, присуства лимфоваскуларне инвазије и ширења туморских ћелија, као и од патохистолошке анализе ресекционих ивица. За уклањање малигних тумора у Т1 стадијуму примењују се технике као што су ендоскопска мукозна ресекција, субмукозна ресекција и ресекција у целини, а избор методе зависи од величине и локализације тумора. Иако ове методе пружају мању инвазивност и бржи опоравак пацијента у поређењу са традиционалним хируршким захватима, одређени случајеви са повећаним ризиком од лимфогене дисеминације захтевају додатне хируршке интервенције за уклањање мезентеричних лимфних чворова. Упркос предностима, многи пацијенти у раним стадијумима болести и даље се директно упућују на хируршко лечење (49).

Класично хируршко лечење је кључно у терапији колоректалног карцинома, са циљем уклањања тумора и захваћених лимфних структура. Избор оперативног захвата зависи од локализације тумора и начина његовог ширења. Основне процедуре укључују десну и леву хемиколектомију, проширене верзије ових интервенција, тоталну колектомију и тоталну мезоректалну ексцизију. Све процедуре се изводе у складу са онколошким принципима како би се минимизовао ризик од рецидива и осигурала оптимална прогноза (49, 50). Принципи хируршке ресекције наглашавају уклањање сегмената дебелог црева са захваћеним крвним судовима и лимфним чворовима. Код метастатске болести, одлука о ресекцији зависи од обима метастаза и сложености захвата. Адекватна ресекција подразумева минимум 12 лимфних чворова у узорку, док нови параметри, попут односа позитивних и укупних лимфних чворова, пружају додатну вредност у процени (51, 52). Лапароскопска хирургија представља значајан напредак у терапији колоректалног карцинома, пружајући мање инвазивну алтернативу традиционалној отвореној хирургији. Истраживања су показала да овај приступ смањује хируршку трауму, интензитет постоперативног бола, време хоспитализације и ризик од инфекција, истовремено омогућавајући бржи опоравак пацијената. Ипак, онколошка адекватност лапароскопске хирургије у поређењу са отвореним приступом остаје предмет истраживања (47, 53). Студије о лапароскопској тоталној мезоректалној ексцизији указују на предности попут смањеног губитка крви и бржег повратка функције црева (53). Рандомизована испитивања, попут *ACOSOG Z6051* (енгл. *American College of Surgeons Oncology Group*) и *ALaCaRT* (енгл. *Australasian Laparoscopic Cancer of the Rectum Trial*), нису показала супериорност лапароскопског приступа у постизању онколошких стандарда (54, 55).

Роботска хирургија, као новији приступ у колоректалној хирургији, нуди побољшану прецизност и визуализацију током сложених процедура. Почетни резултати указују на онколошку еквивалентност у поређењу са лапароскопском хирургијом, уз потенцијалне предности у смањењу компликација и бржем опоравку пацијената (47, 56). Међутим, потребне су даље студије како би се у потпуности проценила улога роботске хирургије у лечењу ректалног карцинома.

1.1.5.2. Радиотерапија

Неоадјувантна хеморадиотерапија представља стандардни терапијски приступ за пацијенте са узнапредовалим карциномом ректума (стадијум >T3) и лимфним захватањем или угроженим циркуференцијалним резекционим маргинама CRM (енгл. *Circumferential Resection Margin*), како би се омогућила оптимална хируршка ресекција. Њен циљ је смањење величине тумора или стадијума, а одлука о примени заснива се на клиничком стадијуму, одређеном анамнезом, физикалним прегледом и радиолошким методама као што су магнетна резонанција карлице и ендоскопска ултрасонографија (57, 58). Иако значајно смањује локалне рецидиве, оптимални интервал између завршетка терапије и операције остаје предмет дебате. Иако пацијенти са потпуним патолошким одговором могу избегнути хирургију, токсичност радиотерапије, укључујући дијареју, уринарну и сексуалну дисфункцију, као и ређе нуспојаве попут фрактура карлице, утиче на квалитет живота (59-62). Нови приступи, попут ендокавитационог зрачења у комбинацији са EBRT (енгл. *External beam radiation therapy*), омогућавају високу стопу локалне контроле чак и без операције, али захтевају пажљиво праћење (63). Примењене дозе радиотерапије од 45–50 Gray-а или кратки протоколи од пет фракција од 5 Gray-а, у комбинацији са флуоропиримидинским агенсима, омогућавају смањење величине тумора за 15–20% (63). Хеморадиотерапија такође игра значајну улогу у очувању органа код одређених пацијената и омогућава радикалну реоперацију у случају делимичне ремисије, док код метастатских болести пружа додатне опције лечења. У раним стадијумима рака ректума омогућава очување органа код 50–60% пацијената (64, 65).

1.1.5.3. Хемиотерапија

Избор терапије за колоректални карцином заснива се на мултидисциплинарном приступу који обухвата карактеристике тумора (локализацију, метастазе, биомаркере), као и стање пацијента (коморбидитети, прогноза). На основу тога, пацијенти се класификују у четири ризичне групе, које диктирају терапијски план. Пацијенти без метастатске болести или са ресектабилним метастазама у јетри или плућима, као и они без знакова лоше прогнозе (нпр. рецидив током адјувантног третмана), сврставају се у Групу 0. Код њих се препоручује хируршка ресекција метастаза, јер хемиотерапија нема значајан утицај на укупно преживљавање (66, 67). Група 1 обухвата пацијенте са потенцијално ресектабилном метастатском болешћу, где индукциона хемиотерапија може омогућити ресекцију. Препоручени режими укључују цитотоксични дуплет или триплет са анти-VEGF (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*) или анти-EGFR терапијом код тумора без мутације KRAS гена (енгл. *Kirsten Rat Sarcoma*). Група 2 укључује пацијенте са нересектабилном дисеминованом болешћу, где је циљ палијативни третман за контролу симптома и успоравање прогресије. Код њих се препоручује комбинација цитотоксичних агенаса са циљаним терапијама, док аблативне методе могу бити применљиве код олигометастатских случајева са добрим одговором на терапију (66, 67). За пацијенте у Групи 3, са ограниченим терапијским опцијама, третман је усмерен на успоравање прогресије болести, уз употребу флуоропиримидина са или без биолошких агенаса. У лечењу већине пацијената са метастатским колоректалним карциномом, примењује се комбинација цитотоксичних агенаса и биолошких терапија, уз индивидуализован приступ на основу карактеристика тумора и пацијента (66, 67). У палијативној терапији прве линије метастатског колоректалног карцинома, флуоропиримидини као што су 5-флуороурацил (5-FU) и капецитабин, уз или без леуковорина (LV), често се користе сами или у комбинацији. Режији као што су FOLFOX (5-FU/LV/оксалиплатин), CAPOX (капецитабин/оксалиплатин) и FOLFIRI (5-

FU/LV/иринотекан) показали су повећање стопе одговора и преживљавања без прогресије, али уз повећану токсичност (68, 69). Терапија друге линије препоручује се пацијентима са очуваном функцијом органа и прилагођава се рефрактарности на претходни третман. Пацијенти отпорни на иринотекан обично се лече режимима који укључују оксалиплатину (FOLFOX или CAPOX), док се они отпорни на FOLFOX или CAPOX лече иринотеканом или FOLFIRI режимом (69). Трајање хемиотерапије зависи од клиничког стања пацијента и може обухватити фиксно трајање (3–6 месеци), индукциони третман праћен терапијом одржавања или континуирани третман до прогресије болести или неприхватљиве токсичности (68). Код ректалних аденокарцинома клиничког стадијума T3 или T4, стандардна пракса је неoadјувантна хеморадиотерапија, утврђена EUS (енгл. *Endoscopic Ultrasound*) или MRI дијагностиком. Терапија може укључивати само радиотерапију или њену комбинацију са агенсима као што су 5-FU и оксалиплатин, који инхибирају репликацију туморских ћелија. Након неoadјувантне терапије, куративна хирургија са циљем R0 ресекције смањује ризик локалног рецидива, иако токсичност радиотерапије и едем ткива могу компликовати хируршке процедуре (70, 71). Адјувантна хемотерапија флуоропиримидинима показала је ефикасност код стадијума II и III CRC (енгл. *Colorectal Cancer*), док је комбинација са оксалиплатином стандард за високоризичне туморе. Скраћење терапије са шест на три месеца код нискоризичних пацијената у стадијуму III смањило је неуротоксичност без угрожавања ефикасности лечења (72, 73). Хемиотерапија игра кључну улогу у лечењу колоректалног карцинома, посебно у метастатској болести и напредним стадијумима. Главни терапијски циљеви обухватају редукцију туморске масе, олакшање хируршке ресекције, контролу симптома, успоравање прогресије и продужење преживљавања, док ефикасност режима зависи од њихове способности да истовремено постигну контролу болести и минимализују токсичне ефекте (74).

1.1.5.4. Биолошка терапија

Системска терапија представља свеобухватни приступ лечењу колоректалног карцинома, који укључује хеморадиотерапију, хируршке интервенције, као и адјувантну хемотерапију и биолошку терапију (74-76). У случајевима метастатских стадијума болести, системска терапија која обухвата комбинацију хемотерапије и биолошке терапије захтева индивидуализован приступ, прилагођен специфичним биолошким маркерима пацијента и карактеристикама малигног тумора (77). Један од првих биолошких агенаса коришћених у лечењу метастатског колоректалног карцинома јесу моноклонска антитела као што је бевацизумаб, која циљају рецептор за васкуларни ендотелијални фактор раста VEGFR (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) (77). Поред бевацизумаба, уведени су и други лекови, укључујући цетуксимаб и панитумумаб, који делују као моноклонска антитела на епидермални фактор раста EGFR, инхибирајући раст тумора (78). Међутим, терапијски ефекти ових лекова значајно зависе од генетских карактеристика тумора, степена мутација, као и ембриолошких разлика између левостраних и десностраних тумора колона и ректума (79). Истраге о перспективама и ефикасности биолошке терапије код метастатског колоректалног карцинома и даље представљају предмет бројних научних студија (78, 79).

1.1.5.5. Имунотерапија колоректалног карцинома

Имунотерапија представља иновативан приступ у лечењу колоректалног карцинома, користећи пацијентов имунски систем за циљано препознавање и уништавање

туморских ћелија уз минимално оштећење здравих ткива (80). Главни механизми обухватају пасивне имунолошке механизме, попут примене моноклонских антитела (енгл. *Monoclonal antibody*, mAb), адоптивног трансфера ћелија (енгл. *Adoptive cell transfer*) и онколитичке виротерапије, као и активне стратегије, попут имуностимулативних цитокина и инхибитора имунолошких контролних тачака. Ове терапије циљају специфичне туморске антигене, попут туморских специфичних антигена (енгл. *Tumor-specific antigens*, TSA) и антигена повезаних са туморима (енгл. *Tumor-associated antigens*, TAA), омогућавајући прецизну антитуморску акцију (81-83). Моноклонска антитела, попут *Cetuximab*, *Bevacizumab*, *Panitumumab*, активирају имунолошке ћелије и подстичу апоптозу туморских ћелија (84-86). Имуноинхибитори, као што су Пембролизумаб и Ниволумаб, циљају протеине PD-1 (енгл. *Programmed cell death protein 1*) и CTLA-4 (енгл. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), показујући високу ефикасност код пацијената са метастатским колоректалним карциномом и високом MSI (87, 88). Остале стратегије укључују развој вакцина против антигена попут CEA и MUC1 (енгл. *The transmembrane glycoprotein mucin 1*) (89), адоптивни трансфер ћелија и примену имуностимулативних цитокина као што су интерферон-алфа (енгл. *Interferon-alpha*, IFN- α) и интерлеукин-2 (енгл. *Interleukin-2*, IL-2) (90). Иако имунотерапија доноси значајан напредак, изазови попут токсичности, трошкова и механизма избегавања имунолошког одговора остају. Будући развој усмерен ка превазилажењу ових ограничења може значајно побољшати исходе пацијената са колоректалним карциномом.

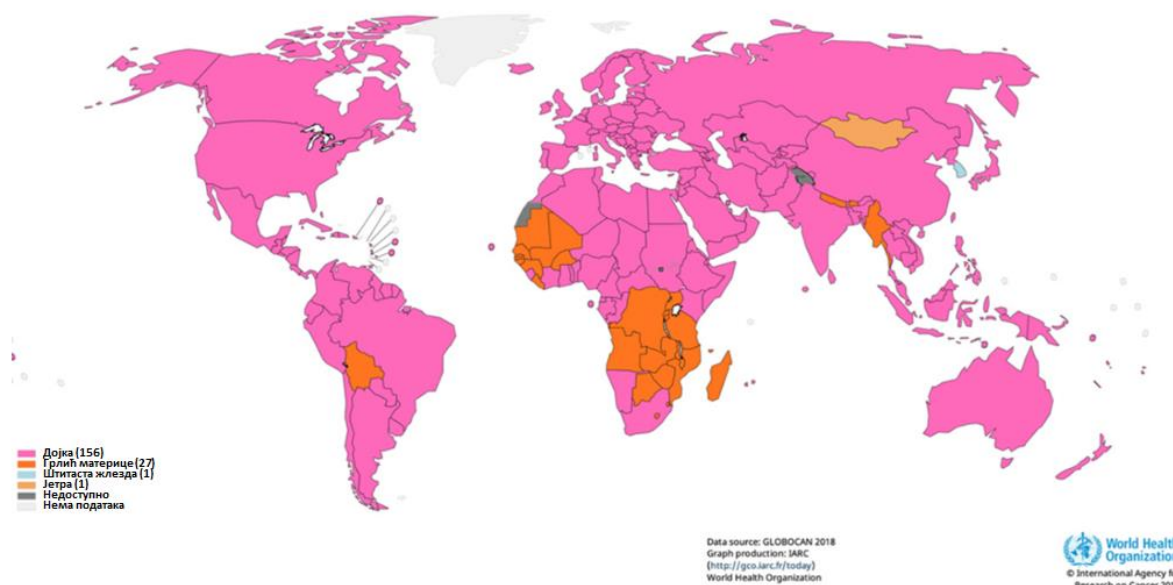
1.2. Карцином дојке

1.2.1. Епидемиолошке карактеристике карцинома дојке

Током последњих деценија, инциденца карцинома дојке значајно је порасла, посебно током 1980-их и 1990-их, углавном захваљујући побољшаној дијагностици. У Сједињеним Државама је забележен пад након смањене употребе замене хормонске терапије, али од 2007. године инциденца поново расте, при чему се као могући узроци наводе повећан индекс телесне масе (енгл. *Body mass index*, BMI) и смањена стопа рађања. У периоду од 2010. до 2019. године, годишњи раст износио је 0,5%, углавном због локализованих облика болести, док су раст популације и старење становништва додатно утицали на укупан пораст (Фигура 3) 1.2.. У протеклих 30 година број новооболелих случајева карцинома дојке порастао је за 128%, а 2020. године овај карцином је постао најчешће дијагностикована малигна болест код жена, са 2,26 милиона нових случајева. Према прогнозама, до 2040. године глобална инциденца карцинома дојке могла би премашити 3 милиона нових случајева годишње (91). У Европи је забележен пад морталитета од карцинома дојке за 10% између краја 1980-их и 2000. године (92), али је 2006. овај карцином остао трећи водећи узрок смртности од малигнитета (93). У Африци, карцином дојке је најзаступљенији малигнитет код жена, са учешћем од 27,6% у укупном броју нових случајева рака код жена и прогнозираним повећањем инциденце за 70% до 2030. године (94). У Азији, карцином дојке је водећи узрок смртности од рака код жена у Кини и Индији (92), док подаци из Ирана указују да жене у тој земљи оболевају у просеку 10 година раније у поређењу са развијеним државама (95).

Глобално, инциденца и морталитет од карцинома дојке значајно су порасли у последњих 25 година, а прогнозе предвиђају даљи раст услед старења популације и промена у животном стилу (91).

Најчешћи карциноми по земљи, старосне стандардизоване стопе у 2018. години, жене, све старосне групе.



Фигура 3. Епидемиологија карцинома дојке. Преузето и кориговано у складу са: <https://mainafoundation.org/breast-cancer-fast-facts/>

1.2.2. Фактори ризика за настанак карцинома дојке

Карцином дојке је један од најчешћих малигнитета код жена, а његов развој је условљен комбинацијом модификујућих и немодификујућих фактора ризика као и заштитних фактора. Разумевање ових фактора је кључно за идентификацију особа са повећаним ризиком и примену одговарајућих превентивних стратегија, укључујући скрининг и промену начина живота.

1.2.2.1. Модификујући фактори ризика

Ови фактори могу се контролисати или ублажити кроз промене животног стила, медицинске интервенције или едукацију. Гојазност је значајан модификовани фактор ризика за настанак дијабетеса типа 2 и карцинома дојке, посредован оксидативним стресом, инсулинском резистенцијом, хипергликемијом и хиперлипидемијом. Код постменопаузалних жена гојазност повећава ризик од карцинома дојке, док код пременопаузалних жена може имати заштитни ефекат, што се приписује варијацијама нивоа естрогена (96). Утврђена је јасна дозно-зависна и временски-зависна повезаност пушења са карциномом дојке, што сугерише узрочну улогу дуванског дима у развоју ове болести. Ризик је посебно изражен код постменопаузалних жена, без значајних разлика у односу на хормонски рецепторски статус или генетску предиспозицију. Карциногени из дуванског дима, као што су полициклични угљоводоници и ароматични амини, имају способност да продру у ткиво дојке и потенцијално надјачају антиестрогенски ефекат пушења (97). Ризик од карцинома дојке повећава се за 7,1% са сваком додатном дневном конзумацијом од 10 g алкохола. Жене које конзумирају веће количине алкохола, од 35 g дневно па навише, имају знатно већи ризик у поређењу са онима које не конзумирају алкохол (98). Седентарно понашање повећава ризик од карцинома дојке кроз механизме као што су гојазност, инсулинска резистенција, системска инфламација, и измене у нивоу полних хормона (99). Репродуктивни фактори, као што су паритет, трајање дојења и

дужина менструалног периода, углавном утичу на ризик од настанка хормонски рецептор-позитивног карцинома дојке. Већи број порођаја и дојење дуже од 6 месеци смањују ризик, док краћа изложеност естрогену услед касне менархе или ране менопаузе такође има заштитни ефекат (100). Ендогени и екзогени естрогени играју значајну улогу у повећању ризика од карцинома дојке. Ендогени естрогени, које синтетишу јајници код жена у пременопаузи, могу деловати као фактор ризика. Уклањање јајника (оваријектомија) показало се као ефикасна мера за смањење тог ризика код жена млађих од 45 година (101). С друге стране, екзогени естрогени потичу углавном из употребе оралних контрацептива и хормонске супститутивне терапије. Иако су формулације оралних контрацептива еволуирале ради смањења нежељених ефеката, ризик од карцинома дојке остаје повишен (102). Хормонска терапија, иако ефикасна у ублажавању симптома менопаузе, повезана је са повећаним ризиком од карцинома дојке, нарочито код формулација које садрже естроген и прогестерон. Престанак хормонске терапије доводи до смањења ризика у року од две године, што указује на реверзибилност хормонски зависних карцинома (103).

1.2.2.2. Немодификујући фактори ризика

Немодификујући фактори представљају аспекте ризика на које појединци не могу утицати, али имају значајну улогу у развоју карцинома дојке. Карцином дојке код старијих жена је озбиљан јавноздравствени проблем, са шестоструко већом инциденцијом и осмоструко већом стопом морталитета у поређењу са млађим женама. Очекује се да ће број случајева карцинома дојке код старијих жена у САД порасти за 72% до 2025. године у односу на 1998. годину, што захтева унапређење здравствене инфраструктуре и развој прилагођених терапијских стратегија (104). Генетска предиспозиција такође игра важну улогу, при чему BRCA1 (енгл. *BR*east *C*ancer *g*ene 1) и BRCA2 (енгл. *BR*east *C*ancer *g*ene 2) гени носе патогене варијанте које значајно повећавају ризик од карцинома дојке код жена. Жене које су носиоци ових варијанти имају до 70% животног ризика за развој болести до 80. године. Ови гени делују као тумор-супресори, учествујући у поправци дволанчаних прекида ДНК, регулацији ћелијског циклуса, апоптози и ремоделовању хроматина. Губитак њихове функције услед патогених мутација доводи до геномске нестабилности и повећаног ризика од карцинома дојке. Ипак, патогене варијанте у BRCA1 и BRCA2 генима објашњавају само око 20% породичних случајева карцинома дојке, што указује на потребу за даљим истраживањима (105).

1.2.2.3. Заштитни фактори

Одређене навике и интервенције могу значајно смањити ризик од карцинома дојке. Дојење се показало као један од значајних заштитних фактора, смањујући ризик за 4,3% за сваки период од 12 месеци дојења, уз додатно смањење од 7% које се бележи са сваким порођајем. Посебно је важно нагласити да дојење смањује ризик од троструко негативног карцинома дојке за 20%, а код носилаца BRCA1 мутација ризик се смањује у распону од 22% до 55% (106). Поред тога, физичка активност такође игра кључну улогу. Жене у постменопаузи које су биле физички активне седам сати недељно, укључујући активности умереног до високог интензитета, показале су смањење ризика од рака дојке за 16% у поређењу са неактивним женама (107). Смањена конзумација алкохола представља још један значајан заштитни фактор. Истраживања су потврдила дозно-зависну повезаност између конзумације алкохола, чак и умерених количина, и ризика од карцинома дојке. У 2012. години забележено је 144.000 случајева карцинома дојке и

38.000 смртних исхода код жена које су конзумирале алкохол, при чему је 18,8% случајева и 17,5% смртности било међу онима које су конзумирале мале количине алкохола. Ови подаци потврђују јаку повезаност између алкохола и карцинома дојке, чак и при ниским нивоима конзумације (108). Примена антиинфламацијских лекова, као што су NSAID, укључујући аспирин и ибупрофен, такође је повезана са смањењем ризика. Мета-анализа која је обухватила 2.788.715 испитаника указује на могућу заштитну улогу ових лекова. Ипак, потребна су даља истраживања како би се боље разумели биолошки механизми који посредују у овој повезаности (109).

1.2.3. Класификација, типови и туморигенеза карцинома дојке

1.2.3.1. Класификација карцинома дојке

Карцином дојке углавном се дели на неинвазивне (*in situ*), инвазивне и метастатске типове, од којих већину чине инвазивни дуктални карциноми и лобуларни карциноми. Инвазивни дуктални карцином је најчешћи тип карцинома дојке, чинећи око 80% случајева, док је лобуларни карцином други по учесталости, са 10–15% свих дијагностикованих случајева. Инвазивни дуктални карцином се може јавити у различитим подтипovima, укључујући тубуларне, медуларне, муцинозне и папиларне карциноме, што захтева прилагођене терапијске приступе. Иако оба типа припадају инвазивним карциномима, разликују се по патолошким и молекулским карактеристикама (110). Неинвазивни карциноми, као што је дуктални карцином *in situ*, развијају се унутар млечних канала и не инфилтрирају околно ткиво, али имају висок потенцијал да постану инвазивни ако се не третирају благовремено (111). Метастатски карциноми представљају најтежи стадијум болести, у којем се туморске ћелије шире на лимфне чворове или удаљене органе, као што су плућа, јетра, кости или мозак. Метастазе могу настати годинама након примарне дијагнозе, а ризик зависи од биологије тумора и стадијума болести у време дијагнозе (112). Ретке врсте, попут филоидних тумора и ангиосаркома, чине мањи проценат свих случајева, али се разликују по агресивности и терапијским изазовима (110).

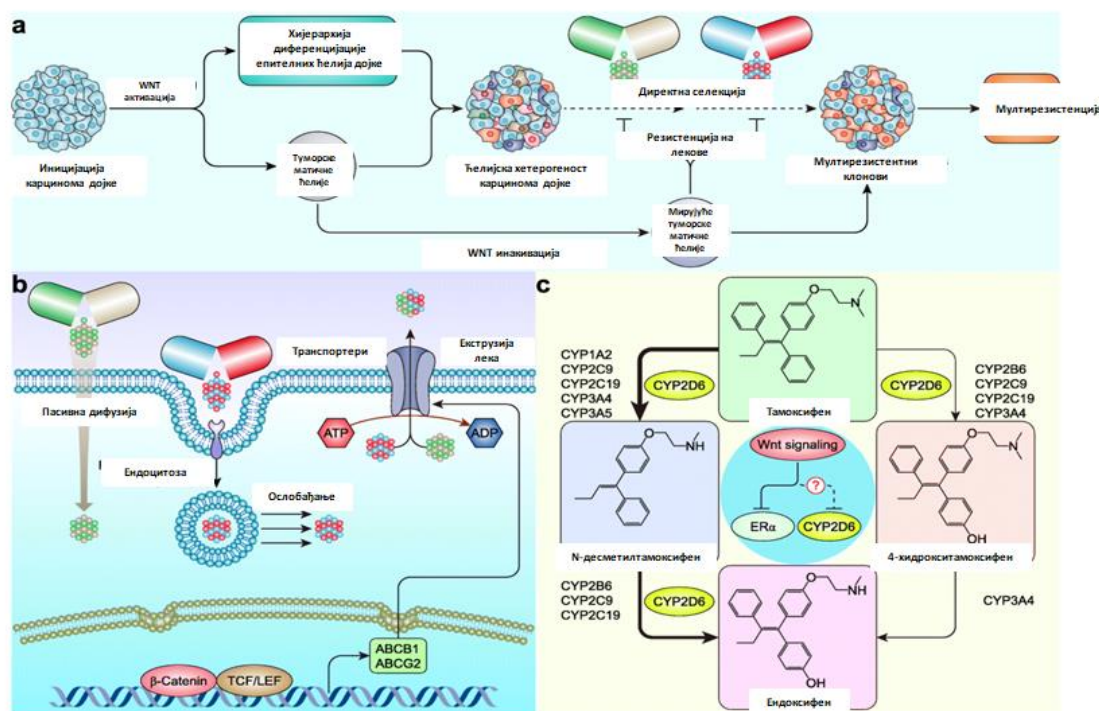
1.2.3.2. Молекулски подтипови карцинома дојке

Карцином дојке класификује се у четири молекулска подтипа: луминални А, луминални Б, HER2 (енгл. *Human epidermal growth factor receptor-2*) -обогаћени и базални, на основу рибонуклеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid*, RNA), протеинских и ДНК карактеристика. Луминални подтипови су најчешћи, при чему луминални Б има већу експресију гена повезаних са пролиферацијом, као што су MKI-67 (енгл. *Marker of Proliferation Ki-67*) и AURKA (енгл. *Aurora Kinase A*), али и учесталије мутације у p53 у односу на луминални А. У оба подтипа може се јавити HER2 амплификација. HER2-обогаћени тумори показују високу експресију HER2-гена, укључујући ERBB2 (енгл. *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*), као и честе мутације у TP53 (72%) и PIK3CA (енгл. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) (39%). Иако су углавном HER2-позитивни, могу бити присутни и у HER2-негативним случајевима (113). Базални подтип карактерише висока експресија базалних кератина, попут KRT5 (енгл. *Keratin 5*), и често је повезан са мутацијама у p53 и BRCA1 (114, 115).

1.2.3.3. Сигнални путеви значајни за настанак карцинома дојке

Постоје значајне сличности између нормалног развоја и прогресије карцинома на молекулском нивоу, при чему су кључни сигнални путеви, који контролишу

пролиферацију, диференцијацију и миграцију ћелија, често нерегулисани код карцинома. Генетске и епигенетске промене омогућавају туморским ћелијама да избегну нормалне контролне механизме, при чему мутације прото-онкогена и инактивација тумор-супресорских гена играју централну улогу. Код карцинома дојке, најважнији сигнални путеви укључују пут рецептора за естроген (енгл. *Estrogen Receptor*, ER), HER2 и Wnt сигнални пут, који регулишу развој млечне жлезде и функције туморских матичних ћелија (110). ER пут игра важну улогу у карциному дојке, који у 75% случајева експримира овај хормонски рецептор (116). Један од главних механизма његовог дејства је интеракција са циклином D1, који активира CDK (енгл. *Cyclin-Dependent Kinase* 4 и 6), омогућавајући прелаз ћелијског циклуса из G1 у S фазу (110). HER2 представља тирозин-киназу која има суштинску улогу у развоју карцинома дојке, нарочито код HER2-позитивних тумора, где његова прекомерна активација подстиче неконтролисану пролиферацију и напредовање тумора. Његова активација иницира бројне сигналне путеве, као што су MAPK (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) и PI3K (енгл. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase*), који су директно повезани са прогресијом и метастазама малигних обољења (117). Канонски Wnt/ β -катенин сигнални пут игра важну улогу у развоју и одржавању ткива, али његова активација је повезана са карциногенезом дојке. Иако су мутације у овом сигналном путу ретке, око 50% карцинома дојке показује висок ниво стабилизованог β -катенина, што је повезано са лошијом прогнозом, посебно код базалних и троструко негативних тумора (110, 118). Активирани β -катенин подстиче самообнављање туморских матичних ћелија и отпорност на апоптозу, док мутације у гену APC циљају популације матичних и прогениторских ћелија у млечној жлезди (Фигура 4). Ово указује да је Wnt сигнализација кључна за иницирање и одржавање карцинома дојке, посебно кроз регулацију популација матичних ћелија. Инхибиција Wnt пута и повезаних механизма показала је потенцијал у смањењу раста тумора и отпорности на терапије (110).



Фигура 4. Приказ Wnt сигналног пута у карциному дојке. Преузето и кориговано у складу са: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-020-01276-5>

1.2.3.4. Генетска основа карцинома дојке

BRCA1 и BRCA2 представљају високо пенетрантне гене са кључном улогом у одржавању геномске стабилности кроз путеве поправке ДНК, као што су хомологна рекомбинација и нехомологно спајање крајева. Мутације у BRCA1, које захватају домене RING (енгл. *Really Interesting New Gene*) и BRCT (енгл. *BRCA1 C-Terminal*), значајно повећавају ризик од карцинома дојке (до 80% доживотно) и јајника (40–65% доживотно), често резултујући агресивним троструко негативним карциномима дојке који потичу из луминалних прекурсорских ћелија, уз транскрипционе и епигенетске промене (119). BRCA2, већи од BRCA1, такође је високо пенетрантан и кодира протеин од 384 kDa, са функционалним сличностима са BRCA1, што објашњава њихову заједничку улогу у наследној предиспозицији за рак. Мутације у BRCA2, попут делеција, инсерција и *nonsense* мутација, доводе до губитка функције тумор-супресорских gena и повећаног ризика од рака жучне кесе, желуца, жучних путева и меланома (120). Гени умерене пенетрантности, попут CHEK2 (енгл. *Checkpoint Kinase 2*), BRIP1 (енгл. *BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase 1*), ATM (енгл. *Ataxia Telangiectasia Mutated*), и PALB2 (енгл. *Partner And Localizer of BRCA2*), удвостручавају ризик од рака дојке и углавном су укључени у поправку ДНК оштећења кроз интеракцију са BRCA1 и BRCA2 путевима. CHEK2*1100delC је најчешћа мутација, док PALB2 мутације значајно доприносе ризику код жена млађих од 50 година и у мањој мери код мушкараца (121).

1.2.4. Клиничка слика, дијагноза и скрининг карцинома дојке

1.2.4.1. Клиничка слика карцинома дојке

Карцином дојке најчешће се манифестује као безболан чворић у дојци. Иако је већина маса у дојци бенигна (само у 3% до 6% случајева они су последица карцинома дојке), попут фиброаденома, циста и фиброцистичних промена, одређене карактеристике могу указивати на малигнитет (122, 123). Знаци укључују чврсте, неправилне и непокретне чвориће у дојци или пазушној регији, отицање дојке, промене коже (црвенило, улцерације или изглед коре поморанџе), као и промене на брадавици попут увлачења или исцедка. Сам бол у дојкама ретко указује на малигнитет у одсуству других симптома (123).

1.2.4.2. Дијагноза карцинома дојке

Дијагностика обухвата низ метода за рано откривање и планирање терапије:

Клинички преглед: инспекција и палпација омогућавају откривање абнормалности као што су масе и промене на кожи или брадавицама. Преглед укључује палпацију свих квадраната дојке, као и аксиларних и супраклавикуларних лимфних чворова (123).

Радиолошко снимање: мамографија је златни стандард за скрининг код жена старијих од 40 година. Ултразвук је користан за процену палпираних маса или код пацијената са густим дојкама. MRI се користи у сложеним случајевима, попут процене генетских предиспозиција или прецизног одређивања величине тумора (124).

Биопсија: биопсија ткива дојке је стандардна метода за хистопатолошку анализу, док се фина иглена аспирација (енгл. *Fine Needle Aspiration*, FNA) примењује за цитолошку процену (123, 125).

Хистопатолошка и имунохистохемијска анализа: анализа ткива одређује присуство тумора, његов тип и експресију хормонских рецептора (ER, PR, HER2) (126).

Генетско тестирање и молекуларна анализа: тестови као што су *Oncotype Dk* и *MammaPrint* пружају процену ризика од рецидива и одговора на терапију (127).

СТ и позитронска емисиона томографија (енгл. *Positron Emission Tomography*, PET): Ове методе се користе за процену метастаза и обима болести у узрапредовалим стадијумима (128). Комбинација ових метода омогућава свеобухватну процену и прилагођено планирање терапијских стратегија за сваког пацијента.

1.2.4.3. Скрининг карцинома дојке

Програми скрининга карцинома дојке уведени су за жене са просечним ризиком од развоја карцинома како би се оптимизовали исходи кроз рано откривање. За жене са јаком породичном историјом или познатим герминативним BRCA1/2 мутацијама и другим високоризичним патогеним варијантама, скрининг би требало да прати смернице ESMO (енгл. *European Society for Medical Oncology*, ESMO) за смањење ризика и скрининг карцинома у оквиру наследног синдрома дојке и јајника (129). Скрининг за рано откривање карцинома дојке игра кључну улогу у смањењу mortalитета, пре него што се клинички симптоми манифестују. Мамографија представља основну дијагностичку методу у овој области, користећи нискоенергетске рендгенске зраке за визуализацију ткива дојке. Бројне студије су показале да редован мамографски скрининг код жена у старосној доби изнад 40 година значајно смањује смртност од карцинома дојке, уз релативни ризик од смртог исхода (130). Поред мамографије, MRI се све чешће користи у скринингу, посебно код жена са високим ризиком, иако не постоје довољни докази да MRI пружа боље исходе у дугорочној превенцији карцинома дојке (131). Иако скрининг представља темељ раног откривања карцинома дојке и значајно доприноси смањењу смртности, остају изазови повезани са прекомерном дијагностиком, као и различитим ефектима у зависности од старосне групе пацијенткиња.

1.2.5. Лечење карцинома дојке

За третман карцинома дојке користи се више метода које се комбиновано користе за постизање оптималних резултата лечења. Ове методе укључују: хирургију, радиотерапију, хемиотерапију, циљану терапију, ендокрину терапију и неoadјувантну терапију, свака са специфичним разлозима и доказима о ефикасности. Управо из наведеног, лечење треба да обезбеди мултидисциплинарни тим који се састоји од хирурга за дојку, онколога, радиолога, патолога и клиничких медицинских сестара специјалиста, као и психолога, физиотерапеута и генетичара (132).

1.2.5.1. Хируршки третман

Хируршки третман представља основу локалног и регионалног третмана рака дојке. Циљ хирургије је уклањање тумора уз постизање доброг козметичког резултата. Мастектомија се користи када операција очувања дојке није могућа, док је операција очувања дојке, попут широке локалне ексцизије, погодна за мање туморе. Радиотерапија након операције очувања дојке значајно смањује ризик од рецидива. Уопштено, циљ операције уклањања рака дојке је елиминација тумора, одређивање стадијума болести и постизање доброг козметичког исхода (133). Операције очувања дојке, попут широке локалне ексцизије, укључују уклањање тумора са здравим ткивом ради хистолошке анализе, док радиотерапија након операције значајно смањује ризик од рецидива. У случајевима када очување дојке није могуће, мастектомија је алтернативни избор, често препоручен за пацијенте са BRCA1/2 мутацијама или када радиотерапија није опција. Обе методе имају сличне стопе рецидива и преживљавања (132, 133). Аксиларни чворови се процењују биопсијом сентинел чвора или дисекцијом у случају инвазивних тумора.

Позитивни сентинел чворови могу захтевати додатну дисекцију ради прогнозе и лечења, иако ово носи ризик лимфедема (134, 135). Пацијентима након мастектомије обично се нуди опција реконструкције дојке, која може бити аутологна или базирана на имплантатима, у зависности од индивидуалних фактора (136).

1.2.5.2. Радиотерапија карцинома дојке

Радиотерапија представља један од кључних стубова мултидисциплинарног приступа у лечењу карцинома дојке, доприносећи значајном смањењу стопе локалног рецидива и побољшању укупног преживљавања. Индикације за примену радиотерапије зависе од стадијума тумора, молекуларног подтипа и врсте хируршког захвата. Код пацијенткиња са раним стадијумом карцинома дојке, адјувантна радиотерапија након хируршког очувања дојке представља стандардну терапију, јер смањује локорегионални рецидив и продужава преживљавање без болести (137). Код пацијенткиња које су подвргнуте мастектомији, постмастектомијска радиотерапија је препоручена за оне са позитивним лимфним чворовима или високоризичним патолошким карактеристикама (138). Поред тога, радиотерапија игра кључну улогу у лечењу локално узнапредовалог и метастатског карцинома, пружајући палијативне користи код пацијената са коштаним и церебралним метастазама (139).

Радиотерапија делује на ћелије карцинома изазивањем оштећења ДНК кроз два основна механизма. Директним деловањем, јонизујуће зрачење интерагује са молекулима ДНК, доводећи до промене њихове структуре. Индиректно, радијација подстиче апсорпцију високоенергетских таласних дужина од стране молекула у окружењу ДНК, што резултира формирањем високо реактивних слободних радикала. Ови радикали даље индукују стварање реактивних облика кисеоника, изазивајући оксидативни стрес који на крају доводи до смрти ћелија карцинома. Радиотерапија узрокује различите типове оштећења ДНК, укључујући стварање апуринских и апириимидинских места, једноланчане прекиде и дволанчане прекиде, при чему су дволанчани прекиди најозбиљнији и најтеже поправљиви (140).

Савремене технологије значајно су унапредице прецизност достављања дозе радијације, омогућавајући смањење оштећења здравих ткива и побољшање терапијских исхода. Једна од најважнијих иновација у овој области је интензитетом модулисана радиотерапија (енгл. *Intensity-modulated radiation therapy*), као и волуметријски модулисана арк терапија (енгл. *Volumetric-modulated arc Therapy*), које омогућавају бољу конформност дозе и минимизују оштећење околних органа (141, 142). Поред тога, метода задржавања даха током инспирације (енгл. *Deep inspiration breath hold*), примењује се како би се смањила изложеност срца радијацији, што је посебно важно код пацијенткиња са левостраним карциномом дојке (143). Још једна напредна техника је терапија протонским зрачењем која нуди побољшану дистрибуцију дозе и потенцијално смањену токсичност, мада су њене клиничке користи и даље предмет активних истраживања (144). Ове иновације представљају значајан корак ка персонализованом и прецизнијем приступу радиотерапији карцинома дојке, чиме се омогућава већа ефикасност лечења уз смањење ризика од нежељених ефеката.

Иако је технолошки напредак омогућио смањење токсичности, радиотерапија и даље може изазвати акутне и касне нежељене ефекте. Акутни нежељени ефекти укључују радијациони дерматитис, умор и бол у дојци, који се обично повлаче након завршетка терапије (145). Касни нежељени ефекти укључују фиброзу, лимфедем и кардиотоксичност, што представља посебан проблем код пацијенткиња које примају зрачење леве стране грудног коша (146). Дугорочне последице укључују повећан ризик од исхемијске болести срца и секундарних малигнитета, што захтева пажљив одабир

пацијената и примену стратегија за умањење ризика (147, 148). Континуирана истраживања имају за циљ оптимизацију радиотерапијских протокола како би се постигли бољи терапијски исходи уз минимизацију нежељених ефеката. Радиотерапија карцинома дојке наставља да се унапређује, при чему се све више истражују краћи режими парцијалног зрачења дојке (енгл. *Partial breast irradiation*) и хипофракционисана постмастектомијска терапија (енгл. *Hypofractionated post-mastectomy radiation therapy*), који су тренутно у фази клиничких испитивања. Истовремено, туморска геномика све више добија на значају у персонализованом приступу радиотерапији, омогућавајући бољу селекцију пацијенткиња и оптимизацију терапијских исхода. Поред тога, пацијенткиње са метастатским карциномом дојке, посебно оне са олигометастатском болешћу, могу имати значајне користи од стереотаксичне радиотерапије тела (енгл. *Stereotactic body radiation therapy*), која побољшава локалну контролу болести и може допринети продужењу преживљавања (149). Додатно, вештачка интелигенција (енгл. *Artificial intelligence*) све више налази примену у планирању и испоруци радиотерапије, са потенцијалом да побољша прецизност зрачења, унапреди ефикасност лечења и смањи ризик од нежељених ефеката (150).

1.2.5.3. Хемотерапија и хормонска терапија карцинома дојке

Системска терапија, која обухвата хемотерапију и хормонску терапију, представља основу у лечењу карцинома дојке, било као адјувантни третман ради смањења ризика од рецидива, било као примарна терапија код узнапредовалих и метастатских облика болести. Избор терапије зависи од биологије тумора, молекуларног подтипа и стадијума болести. Хемотерапија је посебно индикована код троструко негативног карцинома дојке, HER2-позитивне болести и случајева са високоризичним карактеристикама, док је хормонска терапија основни приступ лечењу хормон-рецептор позитивног карцинома дојке (151). Хемотерапијски агенси циљају брзо дељиве туморске ћелије различитим механизмима, укључујући оштећење ДНК, инхибицију митозе и поремећај поправних механизма. Агенси платине и алкилишући агенси изазивају ДНК адукте, док антиметаболити ометају синтезу ДНК. Инхибитори топоизомеразе доводе до прекида ДНК ланаца, док инхибитори микротубула (нпр. таксани, винка алкалоиди) нарушавају митозу, што доводи до ћелијске смрти. Инхибитори PARP-а (енгл. *Poly-ADP ribose polymerase*) повећавају ефикасност хемотерапије код тумора са BRCA мутацијама блокирајући механизме поправке ДНК. Механизми резистенције, укључујући контролне тачке ДНК оштећења, инхибиторе Bcl-2 и ABC транспортере, умањују ефикасност хемотерапије. Тренутна истраживања испитују стратегије које укључују таргетирање апоптотских путева, аутофагије и инхибицију механизма избацивања лекова како би се побољшали терапијски исходи (152). Хемотерапија се примењује у више клиничких сценарија, зависно од карактеристика тумора и фактора пацијента. Неоадјувантна хемотерапија се користи пре хируршког захвата код локално узнапредовалог карцинома дојке како би се смањила величина тумора, повећала могућност очувања дојке и проценио одговор на терапију (153). Адјувантна хемотерапија се примењује након хируршког лечења у циљу елиминације преосталих микрометастатских ћелија и смањења ризика од рецидива, посебно код пацијенткиња са захваћеним лимфним чворовима, троструко негативног карцинома дојке или HER2-позитивном болешћу, обично у оквиру антрациклин- и таксан-базираних режима (154). Код метастатског карцинома дојке, хемотерапија се користи палијативно како би се продужило преживљавање и побољшао квалитет живота. Избор терапије зависи од претходно примењених третмана, биологије тумора и толеранције пацијента. Најчешће коришћени агенси укључују капецитабин (орални антиметаболит), ерубулин (инхибитор

микротубула за претходно лечене пацијенте) и платинасте агенсе (карбоплатин, цисплатин), који су посебно ефикасни код троструко негативног карцинома дојке и BRCA-мутираних тумора (155). Иако је хемотерапија ефикасна, она је повезана са значајним токсичностима које могу утицати на исходе лечења и квалитет живота пацијената. Хематолошка токсичност, укључујући неутропенију, повећава ризик од инфекција и може захтевати подршку гранулоцитног колоније-стимулишућег фактора (енгл. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF), док анемија и тромбоцитопенија могу захтевати трансфузије (156). Гастроинтестинални нежељени ефекти, попут мучнине, повраћања и дијареје, су чести, али се могу контролисати антиеметикама (157). Неуротоксичност, нарочито периферна неуропатија изазвана таксанима, као и кардиотоксичност, која се најчешће јавља код антрацклина, захтевају прилагођавање дозе и редовно кардиолошко праћење (158, 159). Поред тога, хемотерапија повећава ризик од секундарних малигнитета, нарочито леукемије и мијелодиспластичних синдрома (160).

Код хормон-рецептор позитивног карцинома дојке, хормонска (ендокрина) терапија представља темељ лечења, са циљем блокирања естрогене сигнализације и инхибиције раста тумора. Најчешће коришћени агенси укључују селективне модулаторе естрогенских рецептора (SERMs), као што је тамоксифен, који делује као антагонист естрогена у ткиву дојке и примењује се код пременопаузалних и постменопаузалних жена (161); инхибиторе ароматазе, укључујући анастрозол, летрозол и ексеместан, који инхибирају синтезу естрогена и пожељни су код постменопаузалних пацијенткиња (162); као и супресију функције јајника применом агониста хормона који ослобађа лутеинизујући хормон, попут гозерелина и лупролида, који се често комбинују са инхибиторима ароматазе или тамоксифеном код пременопаузалних пацијенткиња (163). Ендокрина терапија се обично примењује у трајању од 5 година, у зависности од ризика од рецидива, и иако је генерално добро подношљива, може изазвати нежељене ефекте као што су валунге, остеопороза и тромбоемболијски догађаји (164).

1.2.5.4. Циљана терапија карцинома дојке

Развој циљане терапије значајно је унапредио лечење карцинома дојке, омогућавајући селективну интервенцију на молекулске механизме који регулишу раст и прогресију тумора. Код естроген-рецептор позитивног карцинома дојке, примена селективних модулатора естрогенских рецептора (енгл. *Selective Estrogen Receptor Modulators*, SERM) и инхибитора ароматазе (анастрозол, летрозол, ексеместан) ефикасно блокирају естрогенску сигнализацију, чиме се инхибира туморска пролиферација и прогресија болести (165, 166). Код HER2-позитивног карцинома дојке, значајан терапијски напредак постигнут је применом моноклонских антитела, као што су трастузумаб и пертузумаб, као и конјугованих терапијских агенаса попут трастузумаб емтанзин. Ипак, појава резистенције на ове терапије и даље представља значајан терапијски изазов. Троструко негативни карцином дојке, који не експримира хормонске рецепторе нити HER2, сматра се најизазовнијим за лечење. У терапијском приступу примењују се инхибитори PARP-а и инхибитори EGFR, као што је цетуксимаб. Стандардна хемотерапија, укључујући таксане и антрациклине, остаје основа лечења овог подтипа болести. Напредне циљане терапије, као што су инхибитори VEGF, попут бевацизумаба, инхибитори PI3K/AKT/mTOR сигналне пута, као и инхибитори тирозин-киназе (енгл. *Tyrosine Kinase Inhibitors*, TKI), показале су обећавајуће резултате у лечењу метастатског и терапијски резистентног карцинома дојке (165-168). HER2 протоонкоген, који је прекомерно експримиран у 10–12% случајева карцинома дојке, представља кључни терапијски циљ, с обзиром на његову улогу у малигној трансформацији и повезаност са неповољном

прогнозом. Димеризација HER2 са HER3 активира PI3K/AKT сигнални пут, који подстиче преживљавање туморских ћелија, што ову осу чини једним од најважнијих фокуса за нове терапијске стратегије (165).

1.2.5.5. Имунотерапија карцинома дојке

Развој имунотерапије карцинома дојке значајно је убрзан у последње две деценије, нарочито након увођења инхибитора контролних тачака имунског одговора (енгл. *immune checkpoint inhibitors*). До 2022. године, више од 450 клиничких испитивања било је посвећено имунотерапији карцинома дојке, са све већим фокусом на развој вакцина и нових имунотерапијских стратегија. Иако су рана истраживања била углавном усмерена на метастатску болест, уочен је значајан помак ка неoadјувантним испитивањима код раног карцинома дојке (169). Имунотерапија карцинома дојке обухвата активне терапије (туморске вакцине), пасивне терапије (моноклонска антитела и адоптивни ћелијски трансфер), као и неспецифичне имуно-модулаторне терапије, попут инхибитора контролних тачака имунског одговора. Инхибитори PD-1 (енгл. *Programmed cell death protein 1*)/PD-L1 (енгл. *Programmed cell death-ligand 1*) показали су клиничке предности у лечењу метастатског троструко негативног карцинома дојке, нарочито у комбинацији са хемотерапијом или радиотерапијом, иако њихов утицај на укупно преживљавање (енгл. *overall survival*) остаје нејасан. Код хормон-рецептор позитивног и HER2-позитивног карцинома дојке, инхибитори контролних тачака имали су ограничену ефикасност, али су одређене комбинационе стратегије у раном хормон-рецептор позитивног карциному показале потенцијал за повећање патолошког комплетног одговора (170, 171). Инхибитори CTLA-4, као што су тремелимумаб и ипилимумаб, делују обнављањем активности Т лимфоцита у борби против тумора. Иако су претклиничке студије показале потенцијалну ефикасност комбинације PD-1 и CTLA-4 инхибитора, клинички резултати у лечењу карцинома дојке и даље су ограничени, што захтева додатна истраживања (170, 172).

Ћелијска имунотерапија представља иновативан терапијски приступ који користи ћелије имунског система пацијента, укључујући Т лимфоците, урођеноубилачке ћелије (енгл. *Natural killer cells*) и макрофаге, у циљу елиминације туморских ћелија. Иако је ова стратегија показала изузетну ефикасност у лечењу хематолошких малигнитета, њена примена код карцинома дојке је ограничена због механизма избегавања имунског одговора и сложене туморске микросредине (173). CAR-T ћелијска терапија (енгл. *Chimeric Antigen Receptor T cell*, CAR-T) представља један од најперспективнијих приступа у лечењу HER2-позитивног карцинома дојке, али је њена клиничка примена праћена безбедносним изазовима, попут синдрома ослобађања цитокина (енгл. *cytokine release syndrome*) (173, 174). Савремене генерације CAR-T терапије усмерене су на побољшање ефикасности уз истовремено смањење токсичности. Као алтернативни приступ, CAR- урођеноубилачке ћелије представљају опцију са нижом токсичношћу, а њихова способност препознавања тумора кроз антиген-зависне и антиген-независне механизме чини их потенцијално ефикасним у терапији HER2-позитивног карцинома дојке. Тренутно се у клиничким студијама испитује њихова примена, често у комбинацији са другим имунотерапијама ради побољшања терапијских исхода. CAR-макрофаги имају способност да инфилтришу туморско ткиво и мењају имуносупресивну туморску микросредину, чиме појачавају одговор имунског система против тумора. Преклиничке студије показале су охрабрујуће резултате, а тренутно су у току клиничка испитивања која процењују њихову терапијску примену. Иако су напредак и технолошке иновације у области ћелијске имунотерапије значајни, превазилажење имунске резистенције и оптимизација безбедносног профила терапије остају главни изазови (173).

Будућа истраживања усмерена су на даље унапређење CAR-базираних терапија, као и на испитивање стратегија комбинације различитих имунотерапијских приступа ради побољшања исхода лечења карцинома дојке.

Истраживања у области вакцина против карцинома дојке интензивно су се фокусирала на HER2 и различите антигене повезане са тумором (енгл. *tumor-associated antigens*). Иако су резултати HER2-заснованих вакцина варирали, неке клиничке студије указују на њихов потенцијални терапијски значај код пацијенткиња са троструко негативним карциномом дојке. Упркос вишедеценијском истраживању, терапеутске вакцине против карцинома показале су само ограничену клиничку ефикасност. Међутим, савремени напредак у имунологији тумора довео је до развоја нових стратегија, укључујући персонализоване неоантигенске вакцине, ДНК вакцине и РНК вакцине, које обећавају већу специфичност и имуногеност. Поред терапијских приступа, све веће интересовање усмерено је на превентивну вакцинацију против карцинома. Посебно се истражује вакцинација против α -лакталбумина као потенцијална стратегија примарне превенције код пацијенткиња са високим ризиком за развој троструко негативног карцинома дојке (169).

1.3. Примена комплекса прелазних метала у онкологији

1.3.1. Металотерапија

Последњих деценија, једињења која садрже тешке метале привукла су значајну пажњу у научним и медицинским круговима због свог значајног имунотерапијског потенцијала. Ови комплекси, због своје способности да модулишу различите биолошке процесе и циљне молекуле, показују обећавајући утицај у лечењу карцинома и инфективних болести (175). Метали као што су платина (Pt), рутенијум (Ru), злато (Au), као и други метали попут лантана (La) и галијума (Ga), поседују разнолике и иновативне механизме деловања који омогућавају ефикаснији терапијски ефекат у поређењу са традиционалним органским једињењима (176). Ови метали, захваљујући својој способности да формирају комплексе са различитим лигандима, могу да показују већи спектар активности и способност да делују на различите молекулске мете у организму, што их чини перспективним кандидатима у лечењу болести. Клинички одобрени металотерапеутици, као што су цисплатина, карбоплатина и оксалаплатина, дуго су се користили као стандардна терапија за разне типове малигнитета (177). Иако су ти лекови били револуционарни у онкологији, њихова употреба је ограничена бројним факторима, укључујући лошу фармакокинетику, ниску акумулацију на циљним местима, високу токсичност и развој резистенције на лекове. Због тога је континуирано истраживање нових металних комплекса са побољшаним својствима неопходно за надоградњу постојећих терапија. У том контексту, недавно се све више истражује потенцијал комплекса метала као што су платина, рутенијум, иридијум, бакар, али и новији кандидати попут галијума и лантана (175, 176). Ови метали показују обећавајуће резултате као потенцијални антиканцерогени агенси, при чему су многи комплекси тешких метала, као што су комплекси сребра са пиридином, показали јак цитотоксички ефекат на хуманим и мишијим ћелијским линијама, укључујући ћелијске линије хепатоцелуларног карцинома (HepG2), аденокарцинома плућа (A549), карцинома дебелог црева (HT29) и карцинома дојке (MCF-7) (178).

Комплекси метала представљају изузетно обећавајућу стратегију у дизајну нових терапијских деривата, који би могли да реше неке од највећих изазова у онкологији. Ова синергија између различитих метала не само да може повећати ефикасност у лечењу

тумора, већ и да омогући развој нових лекова који су ефикасни против резистентних облика карцинома, као и против различитих микробних инфекција (179). С тим у вези, истраживања у овом правцу постају све важнија, и постоји нада да ће нови комплекси прелазних метала донети значајан напредак у савременим терапијама.

1.3.2. Антитуморска својства цисплатине

Платина (Pt) је прелазни метал, познат по способности да мења свој оксидациони број и гради комплексе са различитим лигандама који садрже азот, кисеоник или хлор. Платина најчешће показује оксидационо стање +2, али може бити у различитим оксидационим стањима од +1 до +4 (180, 181). У зависности од броја језгара Pt(II) комплекси могу бити мононуклеарни или полинуклеарни, при чему полинуклеарни комплекси показују већи биолошки потенцијал од цисплатине, укључујући различите начине везивања за молекуле ДНК, што може превазићи резистенцију на мононуклеарне комплексе (182). Цисплатина, као један од првих комплекса Pt(II), откривена је случајно 1965. године као антибактеријски агенс, а касније је показала значајно антитуморско дејство (183). Механизам њеног дејства подразумева везивање за молекуле ДНК, где формира ковалентне везе са гуанином, нарушавајући структуру и функцију ДНК, што ћелију уводи у апоптозу (184, 185). Комплекси Pt(II) могу формирати различите врсте веза у молекулу ДНК, као што су укрштене везе или интеркалација, што доприноси њиховом цитотоксичном дејству (186). Цисплатина такође изазива формирање реактивних кисеоничних једињења и активирање туморсупресора p53, што зауставља ћелијски циклус (187). Међутим, употреба цисплатине је праћена нежељеним ефектима, као што су нефротоксичност, ототоксичност, мијелосупресија и кардиотоксичност (188). Такође, значајан терапијски проблем представља и развој резистенције, што се објашњава смањеном акумулацијом терапеутика у ћелији (189). Да би се превазишле ове потешкоће, синтетисани су нови комплекси, као што су карбоплатина и оксалиплатина, који показују смањену токсичност, али и развијају резистенцију у туморима који су резистентни на цисплатину. Оксалиплатина је одобрена за терапију колоректалног карцинома, док су комплекси Pt(IV) предмет интензивних истраживања, јер пружају могућност оралне примене и показују значајну антитуморску активност (190). Сатраплатина, један од ових комплекса, показала је велики потенцијал у лечењу тумора резистентних на цисплатину (191). Истовремено, истраживања показују да инкорпорирање комплекса платине у липозомалне партикуле побољшава њихов транспорт до ћелија и смањује нежељене ефекте, као што су нефротоксичност и неуропатија (192). Иако се велики број динуклеарних и полинуклеарних комплекса платине активно проучава, већина ових једињења још увек није прешла у клиничке фазе, већ су углавном у претклиничким истраживањима.

1.3.3. Антитуморска својства паладијума (Pd)

Последњих деценија, истраживања других прелазних метала постала су актуелна, пошто представљају обећавајућу основу за развој нових антитуморских агенаса. Паладијум и платина, припадају групи прелазних метала, а због својих физичких и хемијских сличности са платином, сматра се да комплекси који садрже паладијум имају антитуморска својства слична комплексима платине (193). Комплекси паладијума(II) су недавно испитивани као потенцијални хемиотерапеутици, због њихових структурних и термодинамичких сличности са комплексима платине(II). Истраживања су показала да неки паладијум(II) комплекси показују сличну, па чак и бољу антитуморску активност у поређењу са цисплатином и њеним аналогама. На жалост, потенцијална терапијска

примена паладијум(II) комплекса значајно је отежана због њихове ниже стабилности у организму и веће реактивности према биомолекулима (194, 195).

Комплекси паладијума(II) представљају перспективну категорију терапијских агенаса, захваљујући својој изразитој антитуморској активности која се заснива на способности да инхибирају раст туморских ћелија и изазову апоптозу (196, 197). Различити комплекси паладијума, укључујући тетрануклеарне, динуклеарне и мононуклеарне структуре, показали су изузетну цитотоксичност према различитим људским и животињским туморским ћелијским линијама. Један од значајних приступа у овим истраживањима је синтеза циклосметализованих комплекса паладијума и платине, који садрже пиренил-деривате тио-семикарбазона. *Oliveira* и сарадници, показали су изузетну антипролиферативну активност против људских ћелија карцинома јајника A2780, са IC₅₀ вредностима које су ниже него код стандардне терапије-цисплатине, чиме показују потенцијал у лечењу малигнитета резистентних на цисплатину (198). Такође, комбиновани третман са комплексима паладијума(II) и хлорокином, леком који утиче на инхибицију аутофагије, показао је побољшану апоптозу у метастатском карциному простате, што резултира повећаном цитотоксичношћу и потенцијално корисним терапијским ефектом на карциноме који не одговарају на конвенционалну терапију (199). Динуклеарни комплекси паладијума, који користе различите пиридинске лиганде, показали су значајну цитотоксичност против хуманих (A549) и мишијих (LLC1) ћелијских линија карцинома плућа, као и хуманих (HCT116, SW480) и мишијих (CT26) ћелијских линија карцинома дебелог црева. Такође експримирају и висок афинитет за везивање за ДНК, што указује на њихов потенцијал да успоре раст тумора преко механизма који укључују директно везивање са ДНК (200). *Karami* и колеге су истраживали нове комплексе паладијума који садрже бензхидразид и 2-фууроични-хидразид и показали су изразиту цитотоксичност према ћелијама мишијег карцинома дебелог црева (CT26) и дојке (4T1), а такође су демонстрирали способности да се везују за ДНК изазивајући апоптозу (201). *Dannen* и сарадници су утврдили да паладијум(II) комплекси са цианоксим лигандом имају изражена цитотоксична својства према хуманим ћелијама карцинома јајника (Hela) и колона (WiDr), са нивоима токсичности који су упоредиви са цисплатином, показујући значајну ефикасност у инхибицији раста тумора у *in vivo* моделима, уз минималне токсичне ефекте на здрава ткива (202). Комплекси паладијума(II) су такође истраживани у оквиру фотодинамичке терапије (PDT), где је доказано да паладијум комплекси порфирина генеришу реактивне кисеоничне врсте (ROS) ефикасније него слободни порфирины, што повећава њихов потенцијал за лечење малигних тумора под светлосном радијацијом (203). Комплекси паладијума(II) демонстрирају широк спектар антитуморских активности, било да делују као моно-агенси или у комбинацији са другим терапијским агенсима као што су фотодинамичка терапија. Они показују високу цитотоксичност, инхибирају пролиферацију ћелија и изазивају апоптозу различитих врста тумора, као и потенцијал за лечење тумора отпорних на традиционалне лекове као што је цисплатина. Ова својства чине паладијумове комплексе перспективним кандидатом за будуће терапије у лечењу канцера.

1.4. Комплекси прелазних метала као антимикуробни агенси

Јони метала имају важну улогу у биолошким процесима, што их чини перспективним за развој антимикуробних лекова. Атоми метала лако губе електроне, стварајући позитивне јоне који су растворљиви у биолошким течностима и омогућавају интеракцију са молекулима богатијим електронима, као што су ДНК и протеини (204). Због

специфичних хемијских својстава координационих комплекса и њихове тродимензионалне структуре, прелазни метали, укључујући платину и паладијум, показују велики потенцијал као антимикробни агенси. Антимикробна својства комплекса са металним јонима могу бити последица њихове способности да брзо размењују лиганде, генеришу реактивне кисеоничне врсте (ROS), оштећују ћелијске мембране микроорганизама или оштећују њихову ДНК (205).

Комплекси платине су потврђени као снажни антимикробни агенси, а клиничка истраживања показују њихову ефикасност. Цисплатина је првобитно откривена као средство за инхибицију деобе бактерије *Escherichia coli* (183). *Chlumsky* и сарадници су испитивали механизме антимикробне активности наночестица које садрже платину(II) и паладијум(II). Ове наночестице су се показале ефикасне на четири бактеријске врсте (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) и узроковале оштећење ћелијских мембрана и зида, као и повећану продукцију ROS, оштећење ДНК и смрт бактерија (206).

Такође, *El-Attar* и сарадници су показали да комплекс паладијума(II) поседује значајну антимикробну активност, посебно против *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Aspergillus fumigatus* и са потенцијалном ефикасношћу против патогена резистентних на антибиотике и фунгициде (207). *Zalevskaya* и сарадници су такође доказали да комплекси паладијума показују значајну антимикробну активност, посебно против *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* и MRSA (енгл. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (208). Такође, тетра-катјонски комплекси паладијума(II) показују снажан антимикробни ефекат кроз фото-инактивацију бактерија путем ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (209). Поред тога, наночестице са платином инхибирају размножавање бактерија у денталном плаку, као што су *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* и *Porphyromonas gingivalis* (210). Ранија истраживања показала су да комплекси паладијума са различитим лигандима могу показати варијабилну антимикробну активност. На пример, комплекси паладијума(II) са тетрациклинима показали су активност против сојева *Escherichia coli* који су били резистентни на тетрациклине (211).

Комплекси паладијума, због сличних хемијских и биолошких својстава као платина, али уз мању токсичност, бољу растворљивост у ткивима и липофилност, сматрају се перспективним за развој нових антимикробних лекова (212). Антимикробна својства комплекса који садрже јоне Pt, Pd и друге прелазне метале чине их важним за будућа истраживања усмерена на развој нових и ефикасних антимикробних агенаса.

1.5. Деривати етилендиамин и пропилендиамин-*N,N'*-диацетата

До сада је синтетисано и описано доста лиганда едда типа, као и њихових структурних деривата. Неки од њих су етилендиамин-*N,N'*-диацетат (edda), *N,N'*-диметил-етилендиамин-*N,N'*-диацетат (dmedda), етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропаноат (eddp), етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-пропаноат ((*S,S*)-eddp), етилендиамин-*N,N'*-ди-(*S,S*)-2-(3-метил)-бутаноат ((*S,S*)-eddv)), 1,3-пропандиамин-*N,N'*-диацетат (1,3-pdda), 1,3-пропандиамин-*N,N'*-ди-3-пропаноат(1,3-pddp), 1,3-пропандиамин-*N,N'*-ди-2-(3-цикло хексил) пропаноат (1,3-pddchxr).

Деривати edda лиганда, као и његови хомолози, пружају нове могућности за истраживање у хемији комплекса, као и за примену у индустријским и биолошким процесима, због своје способности да формирају стабилне и селективне комплексе.

Етилендиамин-*N,N'*-диацетат (edda) је тетрадентатни лиганд, што значи да може да се координује са металним јоном путем четири донорска атома - два атома азота и два атома кисеоника. Ова структура омогућава едда лиганду да формира стабилне комплексе са

различитим металима. Из edda лиганда изведено је много различитих деривата, који могу имати различите супституције на основним функционалним групама. На пример: N- или C- супституисани деривати edda - у овим случајевима, атоми азота или угљеника на edda молекулу су замењени за друге групе, што може изменити својства лиганда и његову способност координације са металима. Затим хомолози edda - то су деривати који су структурно слични edda, али имају продужене ланце. На пример: 1,3-пропандиамин-*N,N'*-дисирићетна киселина (H_2pdda) - овај молекул има продужени диамински ланац и две ацетатне групе; етилендиамин-*N,N'*-ди-3-пропионска киселина (H_2eddp) - овај молекул садржи продужени карбоксилатни ланац и може бити примењен за стварање још стабилнијих комплекса са металним јонима. Наведени лиганди се могу синтетисати по методи коју је патентирао Берсворт (Bersworth) још 1955. године (213) и најчешће се координују тетрадентатно за централни метални јон. Лиганди овог типа се лако подлежу реакцији естерификације према већ познатој методи (214).

Ова једињења су често коришћена као хелатни лиганди захваљујући својој изузетној способности да формирају стабилне комплексе са металним јонима различитих оксидационих стања (двовалентним, тровалентним и четворовалентним).

Поред значаја у координационој хемији, лиганди овог типа имају и важно место у бионеорганској хемији, зато што неки од естерификованих деривата показују значајну биолошку активност. На пример естри попут (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропанске киселине и (*S,S*)-1,3-пропилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-циклохексил) пропанске киселине испољавају антитуморску активност која је упоредива, па чак и суперорнија у односу на цисплатину (215, 216).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је испитивање антитуморског дејства комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Синтетисати тетрадентатни лиганд (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине, (H₂-(S,S-(pddtyr)).
2. Синтетисати O,O'-диалкил естре тетрадентатног лиганда (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине, (R₂-(S,S-(pddtyr):
 - O,O'-диетил естар (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине,
 - O,O'-дипропил естар (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине,
 - O,O'-дибутил естар (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине,
 - O,O'-дипентил естар (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине.
3. Синтетисати одговарајуће паладијум(II) комплексе са O,O'-диалкил естрима (H₂-(S,S-(pddtyr) лиганда:
 - дихлоро-O,O'-диетил-(S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) ацетато паладијум(II) комплекс,
 - дихлоро-O,O'-дипропил-(S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) ацетато паладијум(II) комплекс,
 - дихлоро-O,O'-дибутил-(S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) ацетато паладијум(II) комплекс,
 - дихлоро-O,O'-дипентил-(S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) ацетато паладијум(II) комплекс.
4. Састав добијених лиганада и комплекса утврдити на основу резултата елементалне микроанализе.
5. Структуру лиганада и наглађених комплекса предвидети на основу њихових инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра (¹H и ¹³C NMR).
6. Анализа потенцијалног антитуморског ефекта синтетисаних комплекса паладијума(II) *in vitro* на мишијим ћелијским линијама колоректаног карцинома (CT26), карцинома дојке (4T1) и мезенхималних матичних ћелија (mMSCs) и хуманим ћелијским линијама карцинома колона (HCT116) и карцинома дојке (MDA-MB-468).
7. Анализа релативног односа некротске и апоптотске смрти туморских ћелија хуманог карцинома колона (HCT116) изазване испитиваним комплексима паладијума(II).

8. Анализа молекулских механизма потенцијалне про-апоптотске активности комплекса паладијума(II).

9. Испитати утицај новосинтетисаних комплекса паладијума(II) на ћелијски циклус HCT116 ћелија *in vitro*.

2.2. Радне хипотезе истраживања

1. Добијени резултати елементалне микроанализе за паладијум(II) комплексе показују да су израчунате вредности у сагласности са нађеним вредностима за процентуални састав угљеника, водоника и азота.
2. IR (енгл. *Infrared*) и NMR (^1H и ^{13}C) спектри за паладијум(II) комплексе показују предвиђену структуру комплекса.
3. Новосинтетисани комплекси паладијума(II) показују значајни цитотоксички ефекат на малигне ћелије (CT26 (енгл. *Colon Tumor 26*), 4T1 (енгл. *4 Tumor 1*), HCT116 (енгл. *Human Colorectal Tumor 116*) , MDA-MB-468 (енгл. *MDA-M.D. Anderson Cancer Center, MB- Metastatic Breast 468*) у *in vitro* условима у поређењу са слабијим цитотоксичним ефектом на мишије мезенхималне матичне ћелије mMSCs (енгл. *mouse Mesenchymal Stem Cells*).
4. Новосинтетисани комплекси паладијума(II) индукују апоптотску смрт малигних ћелија
5. Новосинтетисани комплекси паладијума(II) повећавају експресију ефекторских апоптотских протеина, каспазе-3.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Хемикалије и инструменти

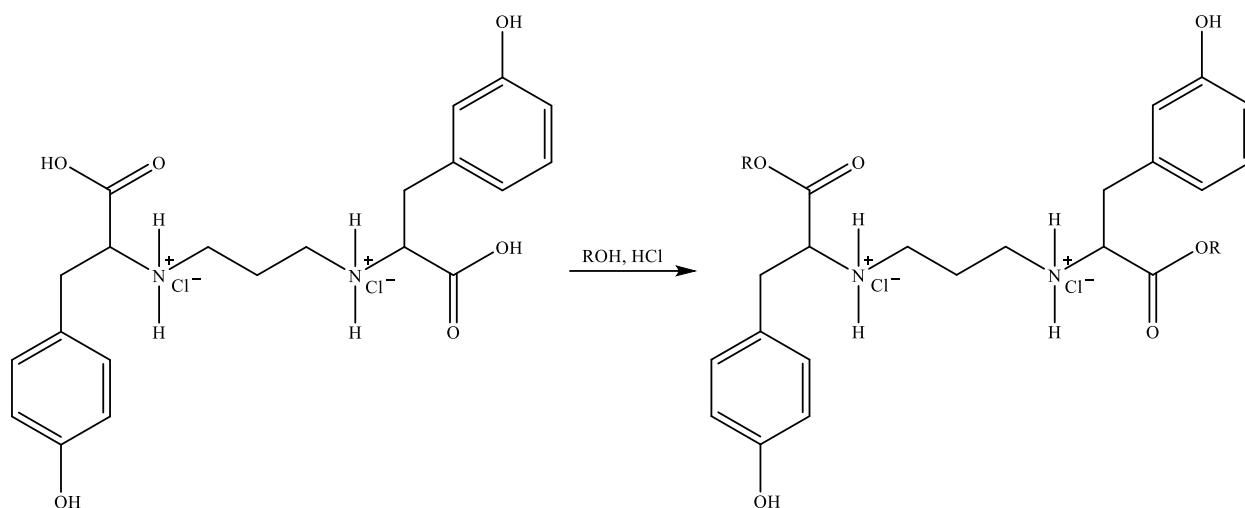
Хемикалије потребне за синтезу лиганада и комплекса су набављене из комерцијалних извора и коришћене без додатног пречишћавања. Тетрадентатни лиганд, $\text{H}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, односно (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетна киселина дихлорхидрат дихидрат, синтетисан је према раније описаној процедури (217). У раствор који је добијен растварањем 1,12 g (0,028 mol) натријум-хидроксида (NaOH) у довољној количини воде додаје се у малим порцијама 5,00 g (0,028 mol) тирозина. Смеша се рефлуктује 3 сата уз постепено додавање 1,43 mL (0,014 mol, $\rho=1,98\text{ g/mL}$) 1,3-дибромпропана и 1,48 g (0,014 mol) анхидрованог натријум-карбоната (Na_2CO_3). Након рефлуктовања реакциона смеша се охлади и уз помоћ раствора хлороводоничне киселине (HCl) (1:1) подеси се pH вредност на 5. Издваја се беж талог који се процеди, испере водом и осуши на ваздуху.

Елементалне микроанализе (C,H,N) су урађене применом стандардних аналитичких метода на Институту за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу, Републике Србије. Инфрацрвени (IR) спектри снимљени су на PerkinElmer, Spectrum Two FT-IR спектрофотометру, применом KBr технике у опсегу од 400 до 4000 cm^{-1} . Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра (^1H и ^{13}C NMR) синтетисаних једињења вршена су помоћу спектрофотометра Varian Gemini-2000 (200 MHz) користећи $\text{DMSO-}d_6$ као растварач. Хемијска померања су дата у односу на тетраметилсилан (TMS) као стандард.

Хумани серум албумина (ХСА), ДНК који је изолован из грудне жлезде телета (ЦТ-ДНК), етидијум бромид (ЕВ) и диметилсулфоксид (DMSO) су купљени од Sigma-Aldrich и коришћени су без пречишћавања. Раствори ХСА, ДНК и ЕВ припремљени су растварањем у фосфатном пуферу (PBS, $5\times 10^{-2}\text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,4) уз додатак $0,15\text{ mol/dm}^3$ NaCl, након чега су мешани на 277 K током 3 дана и чувани до једне недеље. Концентрација основног раствора ЦТ-ДНК одређена је UV апсорпцијом на 260 nm, користећи моларни апсорпциони коефицијент од $6600\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}$ (218). Чистоћа ДНК потврђена је одређивањем односа апсорбанције при 260/280 nm, који је био у опсегу 1,8-1,9, указујући на довољну чистоћу ДНК без присуства протеина (219). За припрему свих раствора коришћена је бидестилована вода. Емисиона мерења су спроведена помоћу RF-1501 PC спектрофлуорометра (Shimadzu, Japan). Таласна дужина за екситацију је фиксирана, док је опсег емисије подешен пре почетка мерења, уз ширење прореза за екситацију и емисију на 10 nm. Мерења вискозности спроведена су коришћењем Anton Paar DMA 4100 М вискозиметра.

3.2. Синтеза лиганада (L1-L4)

Поступак синтезе диалкилестара је већ раније описан (220). У 40 mL апсолутног алкохола (етанол, *n*-пропанол, *n*-бутанол или *n*-пентанол) претходно zasiћеног гасовитим хлороводоником додаје се 5 g (9,82 mmol) претходно синтетисане (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине, $\text{H}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Шема 1) уз рефлуктовање реакционе смеше у трајању од 12 сати. Након хлађења реакционе смеше до собне температуре, врши се упаравање до сува помоћу вакуум упаривача. Настали окер талог је остављен да одстоји преко ноћи. Потом се наглађеном естру додаје раствор етилацетата и након третмана у ултразвучној кади добијена суспензија је одвојена центрифугирањем. Талог добијен центрифугирањем је испран етром.



R = Et(L1), *n*-Pr(L2), *n*-Bu(L3), *n*-Pe(L4)

Шема 1. Општа процедура за синтезу нових лиганада (L1-L4).

***O,O'*-диетил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрат, Et₂-S,S-pddtyr·2HCl (L1)**

Принос за *O,O'*-диетил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрата, Et₂-S,S-pddtyr·2HCl је 3,45 g (66,1%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд Et₂-S,S-pddtyr·2HCl, M (C₂₅H₃₆Cl₂N₂O₆) = 531,44 g, израчунато (%): C, 56,49; H, 6,83; N, 5,27; нађено (%): C, 56,65; H, 6,96; N, 5,34.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,96-1,11 (t, 6H, C¹¹H₃), 2,05-2,31 (m, 2H, C⁹H₂), 2,86-3,19 (m, 4H, C⁸H₂), 3,28-3,41 (dd, 4H, C³H₂), 3,95-4,09 (m, 4H, C¹⁰H₂), 4,11-4,22 (m, 2H, C²H), 6,65-6,78 (m, 4H, C^{6a,6b}H), 6,96-7,12 (m, 4H, C^{5a,5b}H), 8,38-8,71 (s, 2H, OH), 9,51-10,43 (d, 4H, NH₂).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13,88 (C¹¹H₃), 22,51 (C⁹H₂), 34,48 (C³H₂), 43,43 (C⁸H₂), 61,86 (C²H), 65,05 (C¹⁰H₂), 115,42 (C^{6a,6b}H), 124,32 (C⁴), 130,43 (C^{5a,5b}H), 156,78 (C⁷H), 168,29 (C¹OOEt).

IR (cm⁻¹): 3080-3030 (ν(=CH))_{ar}, 2980-2850 (ν(CH)), 1737 (ν(C=O)), 1614, 1516, 1467, 1446 (ν(C=C))_{ar}, 1234 (ν_{as}(C-O)), 1175(ν_s(C-O)), 851, 830, 781 (γ_{ar}(=CH)).

***O,O'*-дипропил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))сирћетне ксиелине, дихлорхидрат, Pr₂-S,S-pddtyr·2HCl (L2)**

Принос за *O,O'*-дипропил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине, дихлорхидрата, Pr₂-S,S-pddtyr·2HCl је 3,78 g (68,8%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд Pr₂-S,S-pddtyr·2HCl, M(C₂₇H₄₀Cl₂N₂O₆) = 559,49 g, израчунато (%): C, 57,96; H, 7,21; N, 5,00; нађено (%): C, 58,14; H, 7,33; N, 5,04.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,67-0,81 (t, 6H, C¹²H₃), 1,34-1,54 (m, 4H, C¹¹H₂), 2,07-2,28 (m, 2H, C⁹H₂), 2,87-3,17 (m, 4H, C⁸H₂), 3,27-3,41 (dd, 4H, C³H₂), 3,89-4,02 (m, 4H, C¹⁰H₂), 4,08-4,24 (m, 2H, C²H), 6,67-6,78 (m, 4H, C^{6a,6b}H), 6,97-7,10 (m, 4H, C^{5a,5b}H), 8,55-8,75 (s, 2H, OH), 9,49-10,48 (d, 4H, NH₂).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 10,25 (C^{12}H_3), 21,30 (C^{11}H_2), 22,55 (C^9H_2), 34,48 (C^3H_2), 43,38 (C^8H_2), 60,81 (C^2H), 67,28 (C^{10}H_2), 115,45 ($\text{C}^{6a,6b}\text{H}$), 124,30 (C^4), 130,32 ($\text{C}^{5a,5b}\text{H}$), 156,77 (C^7H), 168,36 (C^1OOPr).

IR (cm^{-1}): 3090-3030 ($\nu(\text{=CH})_{\text{ar}}$), 2939-2879 ($\nu(\text{CH})$), 1737 ($\nu(\text{C=O})$), 1615, 1595, 1517, 1463, 1448 ($\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1230 ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$), 1175 ($\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$), 928, 827, 781 ($\gamma_{\text{ar}}(\text{=CH})$).

***O,O'*-дибутил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрат, $\text{Bu}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}$ (L3)**

Принос за *O,O'*-дибутил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрата, $\text{Bu}_2\text{-S,S-pddtyr}$ је 3,39 g (62,3%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд $\text{Bu}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}$, $\text{M}(\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6) = 587,54$ g, израчунато (%): C, 59,28; H, 7,55; N, 4,76; нађено (%): C, 59,39; H, 7,62; N, 4,79.

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 0,89-0,95 (t, 6H, C^{13}H_3), 0,67-0,81 (m, 4H, C^{12}H_3), 1,34-1,54 (m, 4H, C^{11}H_2), 2,07-2,28 (m, 2H, C^9H_2), 2,87-3,17 (m, 4H, C^8H_2), 3,27-3,41 (dd, 4H, C^3H_2), 3,89-4,02 (m, 4H, C^{10}H_2), 4,08-4,24 (m, 2H, C^2H), 6,67-6,78 (m, 4H, $\text{C}^{6a,6b}\text{H}$), 6,97-7,10 (m, 4H, $\text{C}^{5a,5b}\text{H}$), 8,55-8,75 (s, 2H, OH), 9,49-10,48 (d, 4H, NH_2).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 13,56 (C^{13}H_3), 18,49 (C^{12}H_2), 22,51 (C^9H_2), 29,87 (C^{11}H_2), 34,46 (C^3H_2), 43,35 (C^8H_2), 60,78 (C^2H), 65,43 (C^{10}H_2), 115,40 ($\text{C}^{6a,6b}\text{H}$), 124,27 (C^4), 130,25 ($\text{C}^{5a,5b}\text{H}$), 156,77 (C^7H), 168,34 (C^1OOBu).

IR (cm^{-1}): 3095-3028 ($\nu(\text{=CH})_{\text{ar}}$), 2936-2873 ($\nu(\text{CH})$), 1740 ($\nu(\text{C=O})$), 1615, 1596, 1464, 1448 ($\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1243 ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$), 1176 ($\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$), 934, 830, 784 ($\gamma_{\text{ar}}(\text{=CH})$).

***O,O'*-дипентил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрат, $\text{Pe}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}$ (L4)**

Принос за *O,O'*-дипентил естар (S,S)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихлорхидрата, $\text{Pe}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}$ је 3,86 g (63,9%).

Резултати елементалне микроанализе за лиганд $\text{Pe}_2\text{-S,S-pddtyr}\cdot 2\text{HCl}$, $\text{M}(\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6) = 615,59$ g, израчунато (%): C, 60,48; H, 7,86; N, 4,55; нађено (%): C, 60,57; H, 7,83; N, 4,62.

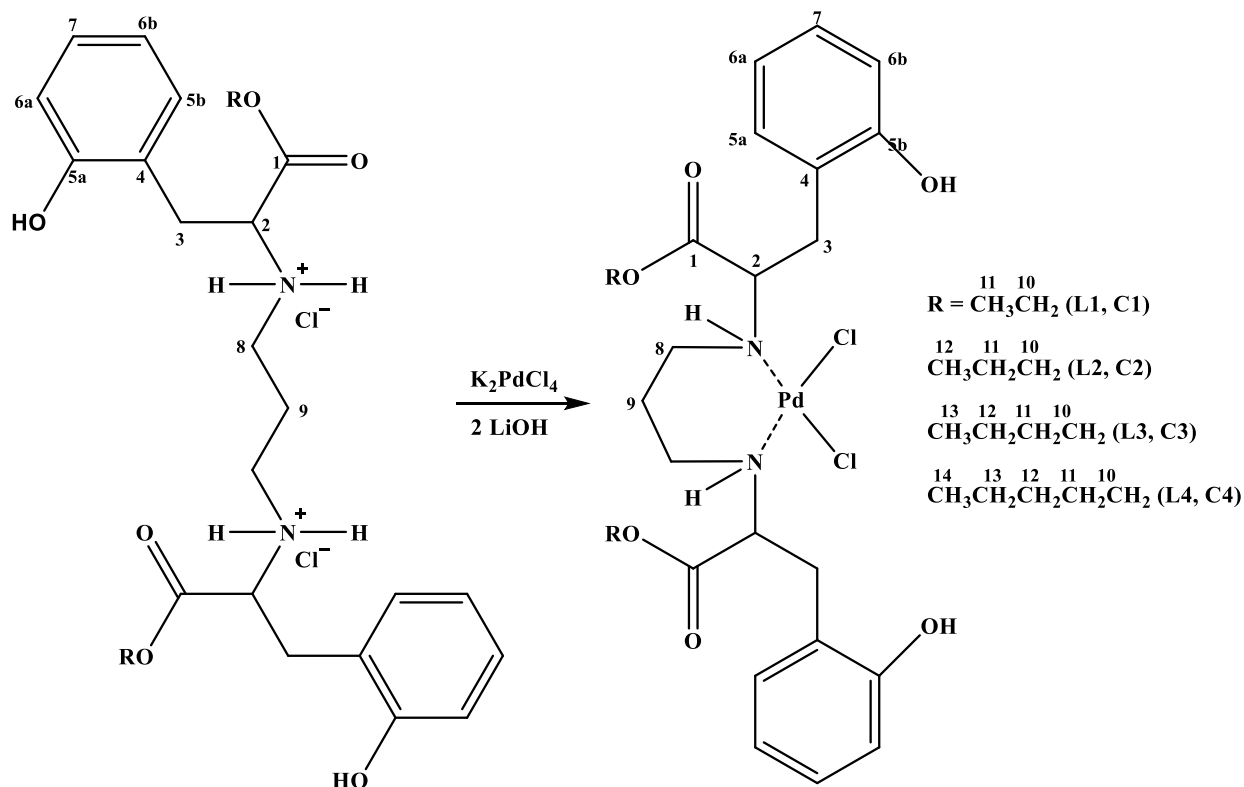
^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 0,74-0,90 (t, 6H, C^{14}H_3), 0,97-1,28 (m, 8H, C^{13}H_2 , C^{12}H_2), 1,31-1,50 (m, 4H, C^{11}H_3), 2,07-2,26 (m, 2H, C^9H_2), 2,84-3,16 (m, 4H, C^8H_2), 3,23-3,42 (dd, 4H, C^3H_2), 3,89-4,05 (m, 4H, C^{10}H_2), 4,07-4,24 (m, 2H, C^2H), 6,67-6,76 (m, 4H, $\text{C}^{6a,6b}\text{H}$), 6,95-7,07 (m, 4H, $\text{C}^{5a,5b}\text{H}$), 8,51-8,81 (s, 2H, OH), 9,40-10,41 (d, 4H, NH_2).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 13,94 (C^{14}H_3), 21,85 (C^{13}H_2), 22,68 (C^9H_2), 27,46 (C^{12}H_2), 27,58 (C^{11}H_2), 34,58 (C^3H_2), 43,47 (C^8H_2), 60,84 (C^2H), 65,76 (C^{10}H_2), 115,42 ($\text{C}^{6a,6b}\text{H}$), 124,36 (C^4), 130,30 ($\text{C}^{5a,5b}\text{H}$), 156,80 (C^7H), 168,57 (C^1OOPe).

IR (cm^{-1}): 3100-3030 ($\nu(\text{=CH})_{\text{ar}}$), 2934-2871 ($\nu(\text{CH})$), 1738 ($\nu(\text{C=O})$), 1614, 1595, 1466 ($\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1235 ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$), 1175 ($\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$), 958, 829, 780 ($\gamma_{\text{ar}}(\text{=CH})$).

3.3. Синтеза комплекса (C1-C4)

У водени раствор $K_2[PdCl_4]$ (0,1 g, 0,306 mmol) постепено се у малим порцијама додаје еквимоларна количина лиганда **L1** (0,1626 g), **L2** (0,1712 g), **L3** (0,1797 g) или **L4** (0,1884 g) (**Шема 2**). Пре додавања, естри су растворени у води и неутралисани литијум хидроксидом (LiOH) у молском односу 1:2. Реакциона смеша се меша 2 сата након чега се добијени окер талог одвоји цеђењем, испере водом и суши на ваздуху.



Шема 2. Општи приказ синтезе комплекса **C1-C4** са нумеричким ознакама коришћеним при тумачењу NMR спектра

Дихлоридо-(*O,O'*)-диетил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II) комплекс, $[PdCl_2(Et_2-S,S-pddtyr)]$ (C1**)**

Принос за дихлоридо-(*O,O'*)-диетил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II) комплекс, $[PdCl_2(Et_2-S,S-pddtyr)]$ је 0,1266 g (65%). Резултати елементалне микроанализе за комплекс $[PdCl_2(Et_2-S,S-pddtyr)]$, $M(C_{25}H_{34}Cl_2N_2O_6Pd) = 635,84$ g, израчунато (%): C, 47,22; H, 5,39; N, 4,41; нађено (%): C, 47,31; H, 5,42; N, 4,46.

1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 0,82-1,16 (t, 6H, $C^{11}H_3$), 1,62-1,88 (m, 2H, C^9H_2), 2,67-3,16 (m, 8H, C^8H_2 , C^3H_2), 3,81-4,22 (m, 6H, $C^{10}H_2$, C^2H), 6,55-6,75 (m, 4H, $C^{6a,6b}H$), 6,90-7,19 (m, 4H, $C^{5a,5b}H$), 9,24-9,43 (s, 2H, OH), 5,16-5,79 (d, 2H, NH).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 13,74 ($C^{11}H_3$), 28,79 (C^9H_2), 39,98 (C^3H_2), 50,71 (C^8H_2), 61,01 (C^2H), 61,36 ($C^{10}H_2$), 115,25 ($C^{6a,6b}H$), 125,94 (C^4), 130,02 ($C^{5a,5b}H$), 156,39 (C^7H), 170,47 (C^1OOEt).

IR (cm⁻¹): 3212 ($\nu(\text{NH})$), 3065 ($\nu(\text{=CH})_{\text{ar}}$), 3020-2937 ($\nu(\text{CH})$), 1727 ($\nu(\text{C=O})$), 1612, 1444 ($\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1237 ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$), 1176 ($\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$), 962, 827, 735 ($\gamma_{\text{ar}}(\text{=CH})$), 540 (Pd-N).

Дихлоридо-(*O,O'*)-дипропил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II) комплекс, [PdCl₂(Pr₂-S,S-pddtyr)] (C2)

Принос за дихлоридо-(*O,O'*)-дипропил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) ацетато-паладијум(II) комплекс, [PdCl₂(Pr₂-S,S-pddtyr)], је 0,1403 g (69%).

Резултати елементалне микроанализе за комплекс [PdCl₂(Pr₂-S,S-pddtyr)], M(C₂₇H₃₈Cl₂N₂O₆Pd) = 663,89 g, израчунато (%): C, 48,84; H, 5,77; N, 4,21; нађено (%): C, 48,99; H, 5,81; N, 4,39.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,49-0,88 (t, 6H, C¹²H₃), 1,16-1,56 (m, 4H, C¹¹H₂), 1,64-1,92 (m, 2H, C⁹H₂), 2,65-3,17 (m, 8H, C⁸H₂, C³H₂), 3,74-4,05 (m, 4H, C¹⁰H₂, C²H), 6,55-6,77 (m, 4H, C^{6a,6b}H), 6,86-7,06 (m, 4H, C^{5a,5b}H), 9,22-9,45 (s, 2H, OH), 5,17-5,73 (d, 2H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 10,14 (C¹²H₃), 21,30 (C¹¹H₂), 29,11 (C⁹H₂), 39,95 (C³H₂), 49,69 (C⁸H₂), 66,65 (C²H), 66,87 (C¹⁰H₂), 115,23 (C^{6a,6b}H), 125,93 (C⁴), 130,08 (C^{5a,5b}H), 156,35 (C⁷H), 170,56 (C¹OOPr).

IR (cm⁻¹): 3213 ($\nu(\text{NH})$), 3032 ($\nu(\text{=CH})_{\text{ar}}$), 2970-2881 ($\nu(\text{CH})$), 1729 ($\nu(\text{C=O})$), 1613, 1445 ($\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1237 ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$), 1176 ($\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$), 931, 827, 735 ($\gamma_{\text{ar}}(\text{=CH})$), 543 (Pd-N).

Дихлоридо-(*O,O'*)-дибутил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II) комплекс, [PdCl₂(Bu₂-S,S-pddtyr)] (C3)

Принос за дихлоридо-(*O,O'*)-дибутил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II) комплекс, [PdCl₂(Bu₂-S,S-pddtyr)] је 0,1547 g (73%). Резултати елементалне микроанализе за комплекс [PdCl₂(Bu₂-S,S-pddtyr)], M(C₂₉H₄₂Cl₂N₂O₆Pd) = 691,94 g, израчунато (%): C, 50,33; H, 6,11; N, 4,04; нађено (%): C, 50,32; H, 6,25; N, 4,15.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,66-0,89 (t, 6H, C¹³H₃), 0,92-1,49 (m, 8H, C¹²H₃, C¹¹H₂), 1,59-1,93 (m, 2H, C⁹H₂), 2,66-3,14 (m, 8H, C⁸H₂, C³H₂), 3,75-4,16 (m, 6H, C¹⁰H₂, C²H), 6,59-6,77 (m, 4H, C^{6a,6b}H), 6,90-7,08 (m, 4H, C^{5a,5b}H), 9,25-9,42 (s, 2H, OH), 5,15-5,66 (d, 2H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13,54 (C¹³H₃), 18,47 (C¹²H₂), 29,91 (C¹¹H₂), 30,38 (C⁹H₂), 39,98 (C³H₂), 49,19 (C⁸H₂), 64,41 (C²H), 65,05 (C¹⁰H₂), 115,41 (C^{6a,6b}H), 125,88 (C⁴), 130,05 (C^{5a,5b}H), 156,36 (C⁷H), 170,48 (C¹OObu).

IR (cm⁻¹): 3212 ($\nu(\text{NH})$), 3030 ($\nu(\text{=CH})_{\text{ar}}$), 2960-2872 ($\nu(\text{CH})$), 1726 ($\nu(\text{C=O})$), 1612, 1446 ($\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1239 ($\nu_{\text{as}}(\text{C-O})$), 1175 ($\nu_{\text{s}}(\text{C-O})$), 936, 826, 736 ($\gamma_{\text{ar}}(\text{=CH})$), 540 (Pd-N).

Дихлоридо-(*O,O'*)-дипентил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))ацетато-паладијум(II) комплекс, [PdCl₂(Pe₂-S,S-pddtyr)] (C4)

Принос за дихлоридо-(*O,O'*)-дипентил-(*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) ацетато-паладијум(II) комплекс, [PdCl₂(Pe₂-S,S-pddtyr)] је 0,1367 g (62%). Резултати елементалне микроанализе за комплекс [PdCl₂(Pe₂-S,S-pddtyr)], M(C₃₁H₄₆Cl₂N₂O₆Pd) = 719,97 g, израчунато (%): C, 51,71; H, 6,44; N, 3,88; нађено (%): C, 51,86; H, 6,56; N, 4,02.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 0,71-0,94 (t, 6H, C¹⁴H₃), 1,03-1,32 (m, 8H, C¹³H₂, C¹²H₂), 1,35-1,52 (m, 4H, C¹¹H₃), 1,58-1,80 (m, 2H, C⁹H₂), 2,63-3,11 (m, 8H, C⁸H₂, C³H₂),

3,76-4,13 (m, 6H, C¹⁰H₂, C²H), 6,58-6,76 (m, 4H, C^{6a,6b}H), 6,86-7,06 (m, 4H, C^{5a,5b}H), 9,22-9,39 (s, 2H, OH), 5,23-5,58 (d, 2H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 13,85 (C¹⁴H₃), 21,80 (C¹³H₂), 27,41 (C¹²H₂), 27,52 (C¹¹H₂), 32,33 (C⁹H₂), 39,97 (C³H₂), 50,20 (C⁸H₂), 64,92 (C²H), 65,07 (C¹⁰H₂), 115,39 (C^{6a,6b}H), 125,13 (C⁴), 130,05 (C^{5a,5b}H), 156,41 (C⁷H), 170,79 (C¹OOPe).

IR (cm⁻¹): 3210 (ν(NH)), 3030 (ν(=CH)_{ar}), 2956-2867 (ν(CH)), 1723 (ν(C=O)), 1612, 1444 (ν(C=C)_{ar}), 1236 (ν_{as}(C–O)), 1176 (ν_s(C–O)), 957, 825, 732 (γ_{ar}(=CH)), 541 (Pd–N).

3.4. Интеракције са биолошки значајним молекулима

3.4.1. Интеракције са хуманим серумом албумина (ХСА)

Студије везивања за хумани серум албумина (енгл. *Human Serum Albumin*, HSA) спроведене су мерењем смањења или гашења флуоресценције триптофанског остатка ХСА (2,0×10⁻⁵ M) у фосфатном пуферу (pH 7,4), у присуству и одсуству комплекса. Флуоресцентни спектри забележени су у опсегу од 310 до 450 nm при таласној дужини екситације од 295 nm. Гашење флуоресценције описује се Стерн-Волмеровом једначином (221):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{једначина (1)}$$

где је F₀ интензитет емисије у одсуству једињења, F интензитет емисије у присуству једињења, K_{SV} Стерн–Волмерова константа гашења, K_q константа гашења, τ₀ (10⁻⁸s) (222) просечни животни век ХСА без комплекса и [Q] концентрација једињења. Вредност K_{SV} добија се као нагиб праве F₀/F у односу на [Q].

Константа везивања (K_b) и број места везивања (n) за систем ХСА-комплекс могу се проценити применом следеће једначине (221), користећи податке о интензитету флуоресценције:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K + n \log [Q] \quad \text{једначина (2)}$$

Вредности K и n добијене су из пресека и нагиба праве log(F₀–F)/F у односу на log[Q].

3.4.2. Интеракције са ДНК

Интеракције са ЦТ-ДНК (енгл. *Calf Thymus DNA*) праћене су применом емисионе спектроскопије на собној температури у PBS пуферу (pH 7,4). Комплекси су растворени у смеши од 5% DMSO и 95% PBS пуфера, који је коришћен као растварач у свим експериментима. Мерења флуоресценције извршена су ради испитивања могућности дислокације етидијум-бромида.

Раствору ДНК ([ДНК] = 2,27×10⁻³ mol/dm³) најпре се додаје етидијум-бромид ([EB] = 2,0×10⁻⁵ mol/dm³), а затим се након 30 минута у раствор са етидијум-бромидом додаје раствор испитиваних једињења у различитим концентрацијама (0-6×10⁻⁵ mol/dm³) и мери се промена у интензитету флуоресценције. Спектри су снимани у опсегу таласних дужина од 550 - 700 nm са екситацијом на 323 nm..

K_{SV} је одређена Стерн-Волмеровом једначином, аналогно методологији примењеној у одељку изнад који говори о везивању за ХСА.

3.4.3. Мерење вискозности

Промене у вискозности ДНК мерене су на собној температури у присуству растућих концентрација испитиваних једињења (C1-C4). Вредности густине добијене су директним читавањем и приказане су графички.

3.5. Евалуација цитотоксичне активности

3.5.1. Ћелијске линије хуманог и мишјег порекла

У овој студији је коришћен панел ћелијских линија, укључујући мишје (4T1) и хумане (MDA-MB-468) ћелије карцинома дојке, као и мишје (CT26) и хумане (HCT116) ћелије колоректалног карцинома, а за процену селективности испитиваних комплекса коришћена је ћелијска линија мишијих мезенхималних матичних ћелија (mMSC) произвођача Gibco (Табела 1). Сви експерименти су спроведени уз одобрење Етичког одбора Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Табела 1. Мишје и хумане ћелијске линије коришћене у истраживању

Ћелијске линије	Мишјег порекла	Хуманог порекла
Карцином дојке	4T1 (ATCC CRL-2539™)	MDA-MB 468 (ATCC HTB-132™)
Колоректални карцином	CT26 (ATCC CRL-2638™)	HCT116 (ATCC CCL-247™)
Мезенхималне матичне ћелије	mMSC (Gibco S1502-100™)	/

Све ћелијске линије су култивисане у DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*), прозвођача *Sigma-Aldrich, Munich, Germany*, уз додатак 10% феталног говеђег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum, FBS*), L-глутамин, пеницилина (100 IU/mL), стрептомицина (100 µg/mL) и неесенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*). Култивисање је обављено у асептичним, контролисаним условима са 5% CO₂, према стандардним протоколима. За све експерименте коришћене су само суспензије ћелија са вијабилношћу изнад 95%. Вијабилност ћелија је процењивана применом *trypan-blue* боје, што представља важан корак у обезбеђивању поузданости и валидности експерименталних резултата.

3.5.2. Тест цитотоксичности

Цитотоксични ефекат комплекса и лиганада је испитан применом МТТ теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*) по већ утврђеној процедури (223) и упоређен са дејством цисплатине (*cis*-диаминдихлороплатина(II), CDDP), која се користи као стандардни хемиотерапеутик. Наиме, МТТ тест заснива се на ензимској реакцији у митохондријама живих ћелија, где ензим сукцинат-деhidрогеназа редукује тетразолијумске соли из МТТ једињења у љубичасто обојен формазан (224). Овај тест се мери колориметријски, а интензитет добијене боје је директно пропорционалан броју живих и метаболички активних ћелија. Испитивање је извршено у микротитар плочама са 96 бунарчића и у

сваки бунарчић додато је по 5×10^3 ћелија у 100 μL комплетног DMEM и инкубирано у контролисаним условима током 24 сата. Наредног дана, ћелије су третиране комплексима (**C1-C4**), лигандима (**L1-L4**), и цисплатином као референтним хемиотерапеутиком у дуплим растућим концентрацијама (7,8 μM до 500 μM) током 24 сата. По завршетку инкубације, одливан је супернатант, ћелије су испране, а затим изложене 20% раствору MTT (5 mg/mL PBS) у 100 μL DMEM, и инкубиране додатна 4 сата у стандардним условима. Након тога, медијум је одливан, и у сваки бунарчић додато је 150 μL DMSO (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*) са 20 μL глицинског пуфера. Оптичка густина је измерена на таласној дужини од 595 nm помоћу уређаја *Microplate Multimode Detector, Zenyth 3100*. Проценат вијабилности ћелија израчунат је према једначини 2 (225):

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

где је Е - апсорбанца третираних ћелија, В - апсорбанца контроле (медијум), и К - апсорбанца нетретираних ћелија.

Свака анализа је спроведена у трипликату и три независна експеримента. На основу резултата одређене су IC_{50} вредности које представљају концентрацију потребну за инхибицију раста 50% третираних ћелија у односу на нетретиране, а израчунате су коришћењем софтвера Microsoft Office Excel 2010.

3.6. Анализа апоптотског одговора

У овој студији анализа апоптотског одговора је одређена применом метода двоструког бојења Annexin-ом V-FITC (*BD Biosciences, CA, USA*) и пропидијум-јодидом (PI) (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*), у складу са протоколом утврђеним у претходним истраживањима (226). Ова техника је била кључна за одређивање процента апоптотских ћелија након 24-часовног третмана новосинтетисаним лигандом **L4** и његовим одговарајућим паладијум(II) комплексом, **C4**. У наредним експериментима, ћелије су фиксирани и пермеабелизоване употребом *Cytofix/Cytoperm™* кита, произвођача *BD Bioscience, Heidelberg, Germany*. Након тога, ћелије су инкубиране са антимишјим антителима усмереним на Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*) и каспазу-3, произвођача *Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA* у складу са протоколима из претходних истраживања (227). Анализа третираних ћелија је извршена помоћу проточног цитометра *FACS Calibur (BD Biosciences, CA, USA)*, а обрада података спроведена је коришћењем *FlowJo* софтвера (*Tree Star, Inc., OR, USA*).

3.7. Испитивање утицаја на динамику ћелијског циклуса

Овим истраживањем анализирали смо потенцијалне ефекте новосинтетисаног лиганда **L4** и комплекса **C4** на динамику ћелијског циклуса НСТ116 туморских ћелија, с посебним освртом на промене у експресији Ki-67 и напредовању кроз фазе ћелијског циклуса. Истраживање је укључивало компаративну анализу између ћелија третираних IC_{50} концентрацијама ових једињења и контролне групе нетретираних ћелија. Након 24-часовног периода инкубације после третмана, ћелије су изложене трипсинизацији, три пута испране у фосфатном пуферу и пребројане. Ћелије у свакој епрувети су затим обојене Ki-67 специфичним антителима (*eBioscience, San Diego, USA*) и 1 μL *Vybrant® DyeCycle™ Ruby* боје (*Thermo Fisher Scientific, Inc., USA*). Након пермеабелизације, ћелије су инкубиране са антителима усмереним на циклин Д (Cyclin D) (*Thermo Fisher Scientific, Inc., USA*) за анализу ћелијског циклуса. Узорци су затим анализирани коришћењем проточног цитометра *FACS Calibur (BD Biosciences, CA, USA)*, при чему је

обрађено најмање 15.000 догађаја по узорку. Обрада података извршена је у софтверу FlowJo (*Tree Star, Inc., OR, USA*), омогућавајући детаљну процену фаза ћелијског циклуса.

3.8. Испитивање антимикробне активности

3.8.1. Референтни сојеви коришћени у истраживању

Испитивана једињења су иницијално растворена у DMSO (*Acros Organics, New Jersey, USA*), а потом разблажена у течном хранљивом медијуму како би се постигла финална концентрација од 10%. Као индикатор раста коришћен је ресазурин произвођача *Alfa Aesar GmbH & Co. (KG, Karlsruhe, Germany)*. Антибиотик тетрациклин (*Pfizer Inc., USA*) растворен је у течном хранљивом медијуму тзв. *Mueller-Hinton* бујону (Торлак, Београд), док је антимикотик флуконазол (*Pfizer Inc., USA*) растворен у *tryptone soya* бујону (Торлак, Београд).

Антимикробна активност лиганада и комплекса испитивана је на 11 микроорганизама, од тога, осам сојева бактерија (четири референтна соја и четири клиничка изолата: *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Escherichia coli*, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica*) и три соја квасница (*Candida albicans* ATCC 10231, *Rhodothorula mucilaginosa*, *Saccharomyces boulardii*). Изолати су добијени из Завода за јавно здравље у Крагујевцу, док су преостали микроорганизми из колекције Лабораторије за микробиологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

3.8.2. Припрема суспензије

Бактеријске суспензије су припремљене методом директног прикупљања колонија, при чему је замућеност почетне суспензије подешена денсиметром (*DEN-1, BioSan, Latvia*). По подешавању према 0,5 *McFarland*-а (228), иницијална концентрација бактерија је била приближно 10^8 CFU (енгл. *colony forming units*)/mL, док је суспензија квасница садржала око 10^6 CFU/mL. Додатна десетострука разблажења почетне суспензије су припремљена у стерилном 0,85% физиолошком раствору. Бактеријски инокулуми су добијени из култура бактерија које су инкубиране 24 сата на 310 K на подлози *Müller-Hinton* агара, и разблажени су према 0,5 *McFarland* стандарду до концентрације од око 10^6 CFU/mL. Инокулуми квасница су припремљени из култура инкубираних 48 сати на 26°C на подлози *tryptone soya* агара и разблажени по 0,5 *McFarland* стандарду до концентрације од око 10^4 CFU/mL.

3.8.3. Микродилуциона метода

Антимикробна активност испитиваних супстанци одређена је применом микродилуционе методе у плочама са ресазурином ради утврђивања минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне микробицидне концентрације (MMC) (229). MIC (енгл. *Minimum Inhibitory Concentration*) је најнижа концентрација испитиваног антимикробног агенса која спречава видљиви раст бактерија, док се MMC (енгл. *Minimal Microbicidal Concentration*) односи на концентрацију потребну за убијање свих присутних микроорганизама култивисаних у одређеним условима средине (аеробни услови, температура од 36,6 °C до 37 °C, у трајању од 24 до 48 сати) (230). У сваком бунарчићу микротитар плоче налазило се 100 μ L *Müller-Hinton* бујон за бактеријске сојеve и *tryptone soya* бујона за кваснице. У први ред плоче додат је аликвот од 100 μ L из матичног раствора испитиване супстанце (концентрација 2000 μ g/mL). Након тога,

извршена су двострука серијска разблажења коришћењем вишеканалне пипете, са концентрацијама у распону од 1000 до 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Тетрациклин и флуконазол коришћени су као позитивне контроле. Метода је детаљно описана у постојећој литератури (231). Испитивање је показало да 10% DMSO, коришћен као растварач, не инхибира раст тестираних микроорганизама. Сваки тест укључивао је контролу раста и стерилности, а сви експерименти су изведени у дупликату, при чему су добијене МИС вредности биле константне. ММС одређене су трансфером 10 μL узорка из бунарчића без промене боје индикатора или раста мицелија на хранљивом агар медијуму. На крају инкубације, најнижа концентрација која није показала раст (без формирања колонија) означена је као ММС.

3.9. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво је испитана правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који се тест користи за ту проверу). За вредности са правилном расподелом користи се параметарски Student's тест, док се за неправилну расподелу примењује непараметарски Mann-Whitney тест. Резултати експеримента се изражавају као вредност $\pm$ стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Синтеза и карактеризација диалкил естара и њихових одговарајућих паладијум(II) комплекса

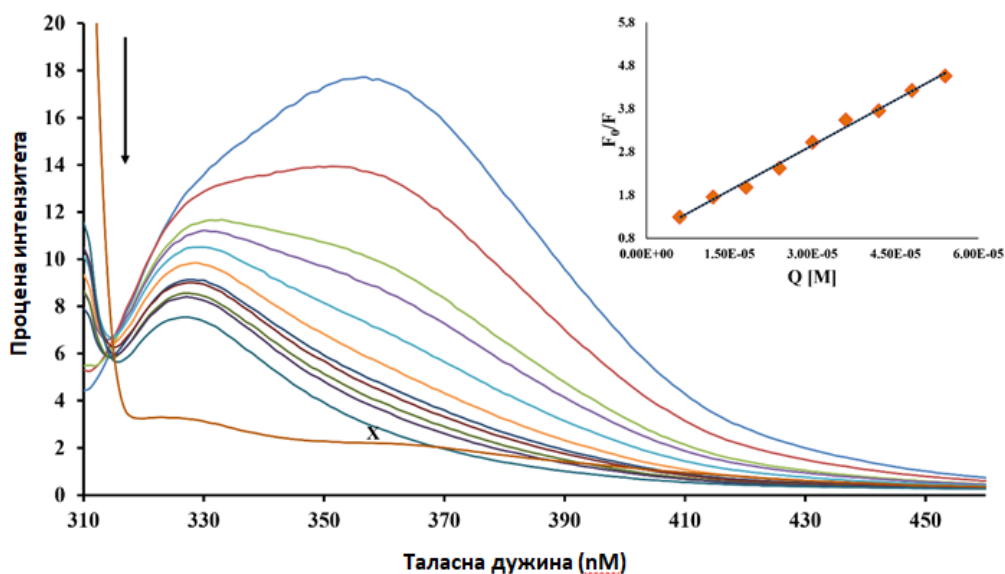
Естри **L1-L4** су синтетисани применом стандардне методе, као што је већ приказано на **Шеми 1** (217, 220). Комплекси паладијума(II), означени као **C1-C4**, добијени су директном реакцијом између $K_2[PdCl_4]$ и одговарајућих естара (**Шема 2**) (232, 233). Синтетисани естри су растворљиви у води и диметилсулфоксиду, док су паладијум(II) комплекси растворљиви у диметилсулфоксиду и диметилформамиду. Структуре новосинтетисаних лиганата и одговарајућих паладијум(II) комплекса предвиђене су на основу резултата елементалне микроанализе и спектроскопских података. За утврђивање начина координације естара за паладијум(II) јон примењене су инфрацрвена (IR) и нуклеарно-магнетно резонанционa спектроскопија (1H и ^{13}C NMR). У инфрацрвеном спектру јака апсорпциона трака карактеристична за $C=O$ уочена је код лиганата ($1737, 1737, 1740$ и 1738 cm^{-1}) и комплекса ($1727, 1729, 1726$ и 1723 cm^{-1}), као и специфичне апсорпционе траке од $\nu(C-O)$ лиганата (**L1-L4**: $1234, 1230, 1243$ и 1235 cm^{-1}) и одговарајућих комплекса (**C1-C4**: $1237, 1237, 1239$ и 1236 cm^{-1}), што јасно указује да није дошло до координације преко атома кисеоника. Положај апсорпционих трака секундарне амино групе комплекса **C1-C4**: $\nu(R_2N-H)$ уочава се на $3212, 3213, 3212$ и 3210 cm^{-1} што указује на координацију лиганата преко атома азота. Остале специфичне апсорпционе траке уочене су на сличним таласним бројевима за одговарајуће лиганде и комплексе, што нам указује на то да ниједан други атом није формирао координациону везу са паладијум(II) јоном. Сигнали у 1H NMR спектрима који потичу од протона естарске групе у лигандима и комплексима показали су слична хемијска померања, што такође указује да није дошло до координације између јона паладијума(II) и кисеоника из поменуте групе. У 1H NMR спектрима, сигнали атома водоника из секундарних амино група уочене су између $5,15-5,79\text{ ppm}$ за комплексе **C1-C4**, док су у лигандима **L1-L4** уочени на око 10 ppm из NH_2^+ амино соли. Кординовање доводи до померања (до $0,6\text{ ppm}$) пропилендиаминског моста (C^9H_2) у спектрима поменутих комплекса и тиме јасно указује на координацију преко атома азота. У ^{13}C NMR спектрима, хемијска померања угљеника из естарске групе уочена су на очекиваном положају, на 168 ppm у лигандима и на 170 ppm у комплексима, што потврђује да кисеоник из поменуте групе није учествовао у координацији. Сви сигнали атома угљеника из алкохолног остатака у лигандима и комплексима уочени су на сличним хемијским померањима. Ароматични атоми угљеника уочени су на око 125 ppm (C^4), 115 ppm (C^{6a}, C^{6b}), 130 ppm (C^{5a}, C^{5b}) и 156 ppm (C^7). Хемијска померања C^2 атома у комплексима су померена за 5 ppm у поређењу са сигнаlima истог атома угљеника у лигандима. Такође, због координације долази до померања сигнала C^8 и C^9 атома угљеника са пропилендиаминског моста око 7 ppm и 8 ppm . Све наведено указује на координацију паладијума(II) јона преко два атома азота.

4.2. Анализа везивања за ХСА

Најважнија улога хуманог серума албумина је транспорт металних јона и металних комплекса као и других биолошки активних једињења у крви (234, 235). Испитивање интеракција између потенцијално активних једињења и ХСА могу бити важни у истраживању њихове потенцијалне биолошке активности и примене (236, 237). Применом флуоресцентне спектроскопије праћене су структурне промене у ХСА узроковане додавањем паладијум(II) комплекса и одредђиване су константе гашења (K_q), константе везивања (K) и број места везивања (n) за комплекс формиран између испитиваних паладијум(II) комплекса и ХСА.

4.2.1. Испитивање интеракције паладијум(II) комплекса са ХСА флуоресцентном спектроскопијом

На Фигури 5. приказани су флуоресцентни спектри ХСА мерени у присуству различитих концентрација комплекса **C1-C4**. Додавањем паладијум(II) комплекса у раствор ХСА, постепено је смањиван интензитет флуоресценције ХСА са порастом концентрације комплекса. Ово смањење у интензитету флуоресценције указује на гашење унутрашње флуоресценције ХСА, што је резултат интеракције између испитиваних комплекса и ХСА.



Фигура 5. Емисиони спектри ХСА у присуству различитих концентрација **C1** комплекса ($T = 298\text{ K}$, $\text{pH} = 7,4$). $[\text{HSA}] = 2\text{ }\mu\text{M}$; $[\text{C1}] = 0\text{-}80\text{ }\mu\text{M}$. График приказује Стерн-Волмерове дијаграм гашења флуоресценције НСА помоћу $[\text{C1}]$. x представља $80\text{ }\mu\text{M}$ $[\text{C1}]$

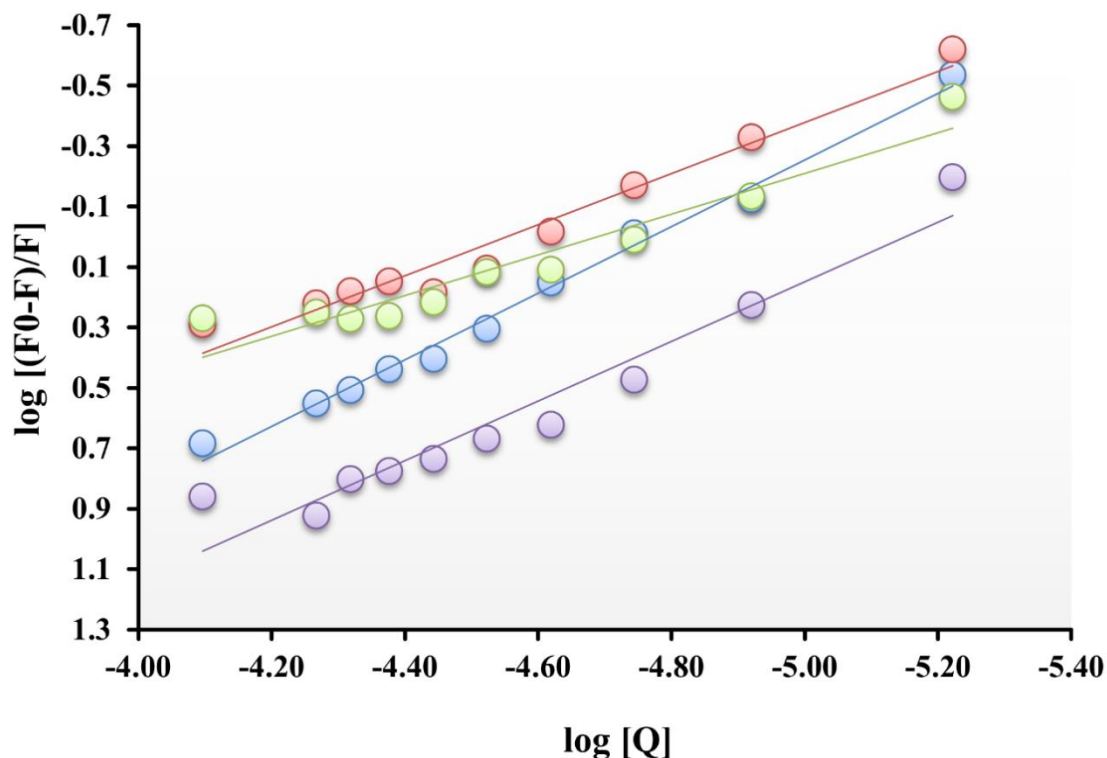
Константе K_{SV} и константе гашења (k_q) добијене су из Стер-Волмерове једначине (једначина 1), уз узимање животног века триптофана у ХСА од $\tau_0 = 10^{-8}\text{ s}$. Како показују резултати у Табели 2, високе вредности константи гашења ($>10^{12}\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) су значајно веће од типичних вредности за гашење флуоресценције биополимера ($10^{10}\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$), што указује да је формиран нови комплекс између свих испитиваних једињења и ХСА и да се интеракција одвија механизмом статичког гашења.

Табела 2 Израчунате константе и параметри везивања K_{sv} , k_q , K_b , n) за комплексе **C1-C4**

комплекс	$K_{SV}\text{ (M}^{-1}\text{)}$	$k_q\text{ (M}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{)}$	R^{2a}	$K_b\text{ (M}^{-1}\text{)}$	n	R^{2a}
C1	$6,37 \times 10^4$	$6,37 \times 10^{12}$	0,99	$1,82 \times 10^5$	1,10	0,99
C2	$3,02 \times 10^4$	$3,02 \times 10^{12}$	0,92	$1,42 \times 10^4$	0,91	0,98
C3	$3,59 \times 10^4$	$3,59 \times 10^{12}$	0,96	$5,90 \times 10^3$	0,80	0,98
C4	$1,45 \times 10^5$	$1,45 \times 10^{13}$	0,97	$4,37 \times 10^5$	1,10	0,98

^a R је коефицијент корелације

Константе везивања (K_b) и број места везивања (n) за комплексе **C1-C4** израчунати су на основу графика $\log(F_0 - F)/F$ према $\log[Q]$ (Фигура 6), користећи једначину 2, а добијене вредности су приказане у Табели 2.



Фигура 6. Гашење флуоресценције ХСА комплекса **C1-C4** на 25° С

Високе константе везивања указују на јаку интеракцију између комплекса и ХСА, што подразумева да ХСА може послужити као транспортер ових комплекса до биолошких мета. Вредност n је приближно један за све комплексе, што указује на присуство само једног места везивања у ХСА за сваки комплекс, чиме се још више потврђује специфичност везивања испитиваних паладијумових комплекса за ХСА.

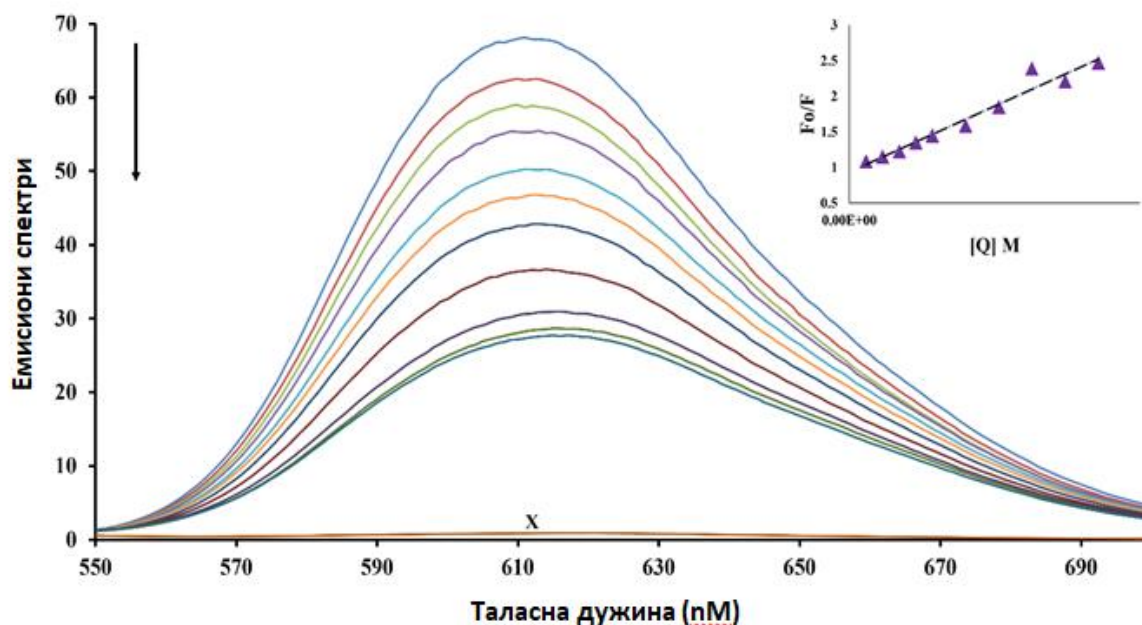
4.3. Студије интеракције синтетисаних комплекса са ДНК

Истраживање интеракција између малих молекула и ДНК игра важну улогу у фармакологији, посебно у процени биолошког потенцијала нових антитуморских агенаса (238). Испитивање интеракције између ДНК и новосинтетисаних комплекса паладијум(II) представља неопходан корак у разумевању њиховог деловања на молекуларном нивоу и њиховог потенцијала као терапеутских агенаса. Истраживања су показала да комплекси прелазних метала могу остварити интеракције са ДНК кроз интеркалацију, везивања у жлебовима или спољашњег електростатичког везивања, што може значајно утицати на њихову биолошку активност (239). У овој студији, методом флуоресцентне спектроскопије анализирана је јачина и начин везивања нових паладијум(II) комплекса за ЦТ-ДНК.

4.3.1. Испитивање интеракција паладијум(II) комплекса са ДНК флуоресцентном спектроскопијом

Етидијум-бромид (ЕБ), као представник интеркалационих маркера, формира флуоресцентне комплексе са нуклеинским киселинама, што га чини изузетно корисним

за истраживање интеракција испитиваних једињења са ДНК. Промене у флуоресцентном спектру система ЕБ–ДНК након додавања паладијум(II) комплекса коришћене су за процену њихове способности да истисну ЕБ из овог комплекса, што омогућава увид у њихову интеракцију са ДНК (240, 241). Флуоресцентни спектри ДНК у присуству и одсуству комплекса **C1-C4** снимљени су на собној температури и приказани су на Фигури 7.



Фигура 7. Емисиони спектри флуоресценције ЕБ-ДНК у одсуству и присуству растућих концентрација **C1** ($T = 298\text{ K}$, $\text{pH} = 7,4$). $[\text{ДНК}] = 2,27 \times 10^{-5}\text{ M}$; $[\text{ЕБ}] = 2 \times 10^{-5}\text{ M}$; $[\text{C1}] = 0-6 \times 10^{-5}\text{ M}$; На графику је приказан дијаграм F_0/F у односу на $[\text{комплекс}]$. X представља $6 \times 10^{-5} [\text{C1}]$

Смањење интензитета емисије система ДНК–ЕБ на таласној дужини од 612 nm, у зависности од концентрације додатих комплекса, указује на то да комплекси конкуришу ЕБ за везивање на ДНК. Ово гашење флуоресценције сугерише да комплекси могу истиснути ЕБ из комплекса са ДНК, указујући на способност интеракције са ДНК, иако се тачан механизам везивања не може још прецизно дефинисати. Израчунате константе гашења, представљене у Табели 3, указују на то да сви комплекси могу истиснути ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК, али се тачан механизам не може одредити само на основу ових резултата. Ова запажања потврђују могућност да синтетисани паладијум(II) комплекси поседују јак афинитет према ДНК, што би могло бити значајно у развоју антитуморских агенаса који делују на молекуларном нивоу.

Табела 3. Стерн–волмерове константе (K_{SV}), константе везивања (K_b) и број места везивања (n) за комплексе **C1-C4**.

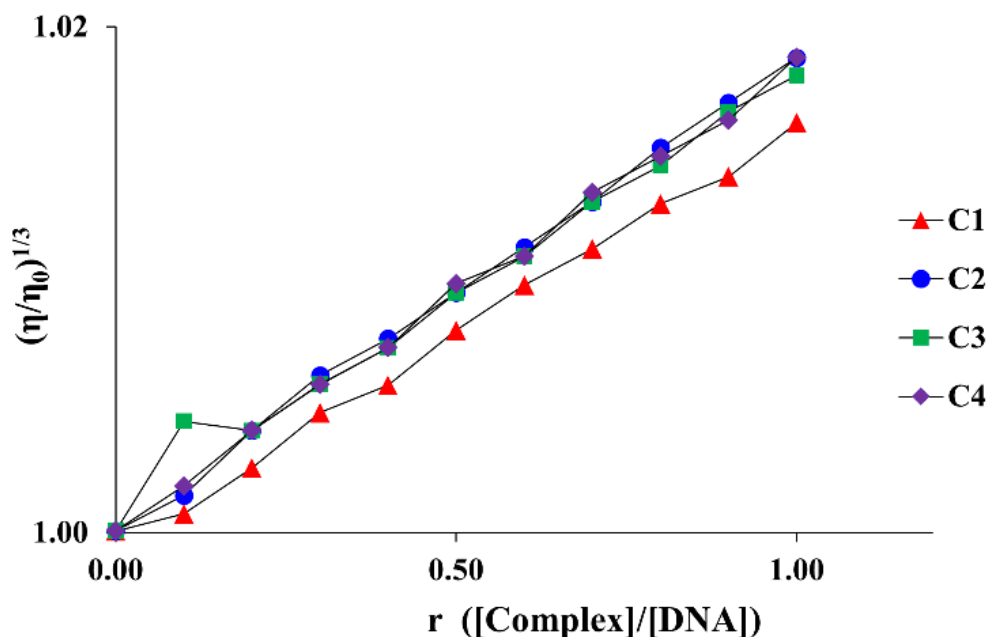
Комплекс	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	$k_q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	R^{2a}	$K_b (\text{M}^{-1})$	n	R^{2a}
C1	$2,64 \times 10^4$	$2,64 \times 10^{12}$	0,96	$6,80 \times 10^4$	1,10	0,99
C2	$9,61 \times 10^3$	$9,61 \times 10^{11}$	0,92	$1,50 \times 10^7$	1,79	0,95
C3	$1,20 \times 10^4$	$1,20 \times 10^{12}$	0,97	$5,42 \times 10^4$	1,15	0,97
C4	$1,02 \times 10^5$	$1,02 \times 10^{13}$	0,98	$1,83 \times 10^5$	1,08	0,95

^a R је коефицијент корелације

4.4. Вискозитет

Испитивање вискозности представља поуздан метод за утврђивање могуће интеракције једињења са ДНК, посебно у случају разликовања интеркалације од неинтеркалационих механизма везивања (242). Показано је да процес интеркалације узрокује продужење ланаца ДНК, јер убацивање молекула унутар структура база доводи до њиховог раздвајања и тиме повећава релативну специфичну вискозност раствора. Стога, мерење вискозности пружа информацију о природи интеракције, јер повећање вискозности указује на присуство интеркалације, док одсуство или минимално повећање сугерише на везивање у жлебовима ДНК.

Резултати вискозиметријских испитивања комплекса **C1-C4** указују на то да ови комплекси не показују интеркалациони начин везивања са ДНК базама. Уместо тога, могуће је да се ови комплекси везују у мање или веће жлебове молекула ДНК, чиме се одржава стабилност његове дужине. Овакви резултати су у складу са претпоставком о спољашњем начину везивања, који не изазива значајне промене у структури ДНК. Детаљне вредности добијене мерењем вискозности приказане су на Фигури 8, чиме се додатно потврђује претпоставка о њиховом везивању у жлебовима ДНК.



Фигура 8. Резултати вискозиметријских испитивања комплекса **C1-C4**

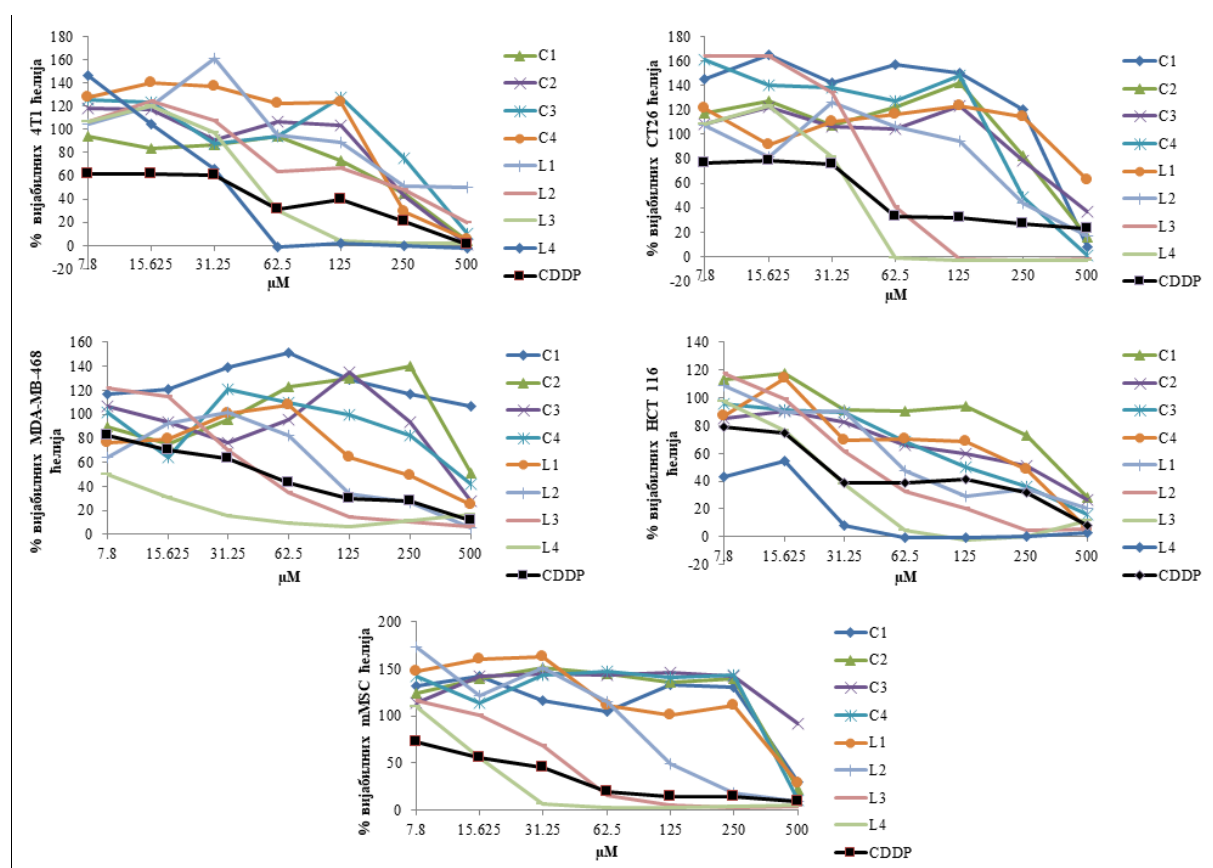
4.5. Процена цитотоксичних ефеката синтетисаних лиганда и паладијум(II) комплекса на ћелије карцинома помоћу МТТ теста

У овом истраживању анализирана је цитотоксичност четири новосинтетисана лиганда, диалкил естара (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине дихидрохлорида (R_2 -*S,S*-pddtyr·2HCl), означених као R = етил (**L1**), пропил (**L2**), бутил (**L3**) и пентил (**L4**), као и њихових одговарајућих паладијум(II) комплекса $[PdCl_2(R_2$ -*S,S*-pddtyr)] (**C1-C4**). Ови комплекси и лиганди тестирани су применом МТТ

теста на различитим ћелијским линијама, укључујући мишје ћелије карцинома дојке (4T1), хумане ћелије карцинома дојке (MDA-MB-468), мишје ћелије колоректалног карцинома (CT26), хумане ћелије колоректалног карцинома (HCT116) и здраве мишје мезенхималне матичне ћелије (mMSC). Овај избор ћелијских линија омогућава разноврсну процену цитотоксичних ефеката, како на канцерогене тако и на неканцерогене ћелије, при концентрацијама од 7,8 до 500 μM током 24 сата.

4.5.1. Испитивање цитотоксичног дејства L4 лиганда и C4 комплекса

Резултати експеримента су показали да лиганди (L1-L4) и комплекси (C1-C4) испољавају умерене цитотоксичне ефекте који зависе од концентрације, са значајним смањењем вијабилности код обе врсте карцинома. Ови дозно-зависни ефекти указују на јасну корелацију између повећања концентрације једињења и смањења процента живих ћелија у свим тестираним ћелијским линијама карцинома. Конкретно, значајно смањење вијабилности забележено је на ћелијама карцинома дојке (мишјих 4T1 и хуманих MDA-MB-468) и колоректалног карцинома (мишјих CT26 и хуманих HCT116), што је приказано на Слици 9.



Фигура 9. Дозно-зависна цитотоксичност комплекса (C1-C4) и лиганда (L1-L4). (А) преживљавање мишјих ћелија карцинома дојке (4T1), (Б) преживљавање хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-468), (В) преживљавање мишјих ћелија колоректалног карцинома (CT26), (Г) преживљавање хуманих ћелија колоректалног карцинома (HCT116) и (Д) преживљавање мишјих мезенхималних матичних ћелија (mMSC) након 24 сата раста у присуству ових једињења

На Фигури 9 је приказано и поређење дозно-зависне цитотоксичности цисплатине (CDDP). Сви подаци су приказани као средње вредности добијене из три независна експеримента, сваки спроведен у трипликату.

Обзиром на значај развоја лекова са ниском токсичношћу, али ефективним антипролиферативним својствима, неопходно је испитати њихову активност на здравим ћелијама *in vitro*. Стога је процена цитотоксичности извршена и на mMSC ћелијама. Резултати су показали да сви тестирани лиганди и комплекси смањују вијабилност mMSC ћелија на дозно-зависан начин (Фигура 9Е), где је уочен постепен пад вијабилности mMSC са повећањем концентрације једињења.

Посебну пажњу привукао је комплекс **C4**, који је показао релативно нижу цитотоксичност на mMSC у концентрацијама од 7,8 до 63,5 μM у односу на његове ефекте на ћелијске линије карцинома, како мишјег (4T1 и CT26) тако и хуманог порекла (MDA-MB-468 и HCT116). Ова разлика у цитотоксичном профилу указује на могућу селективну активност комплекса **C4** према туморским ћелијама, што га чини потенцијалним кандидатом за даља истраживања као селективно цитотоксично средство са мањим штетним ефектима на здраве ћелије. Ова запажања сугеришу да би комплекс **C4** могао бити толерантнији у живим организмима у односу на друге комплексе из исте серије. С друге стране, лиганд **L4** је испољио минималну цитотоксичност на mMSC при нижим концентрацијама (7,8 до 31,25 μM). Ипак, са повећањем концентрације, дошло је до значајног смањења процента вијабилности mMSC, што указује да је при већим концентрацијама потребно бити опрезан због могућих штетних ефеката на здраве ћелије.

У оквиру овог истраживања, одређене су и вредности IC_{50} , које представљају концентрацију потребну за сузбијање 50% вијабилности ћелија, и детаљно су наведене у Табели 4. Овај параметар је кључан за процену ефикасности тестираних једињења, јер одражава степен њиховог утицаја на ћелијску пролиферацију. Резултати анализе показали су да лиганд **L4** има изразито цитотоксично дејство, које је значајно веће у односу на остале лиганде (**L1-L3**) и паладијумове комплексе (**C1-C4**). Супротно томе, референтни хемиотерапеутик, цисплатина (CDDP), показала је виши ниво цитотоксичности према туморским ћелијама у поређењу са испитиваним комплексима **C1-C4**. Међутим, поред своје високе ефикасности против туморских ћелија, цисплатина је показала и значајну цитотоксичност према mMSC, што ограничава њену селективност. Насупрот томе, комплекс **C4** је показивао изражену селективност, са нижим степеном токсичности према mMSC у поређењу са ефектима на ћелијске линије карцинома. Овај резултат указује да би комплекс **C4** могао имати потенцијал као селективно цитотоксично једињење са нижим токсичним утицајем на здраве ћелије.

На основу ових резултата, комплекс **C4** и лиганд **L4** издвојени су као најперспективнији кандидати за даља испитивања на молекулском нивоу, која ће омогућити дубљу анализу њихових механизма дејства на ћелије карцинома, уз посебан акценат на њихову селективност и потенцијалну примену у терапији.

Табела 4. Компаративне вредности IC₅₀ за комплексе **C1-C4**, лиганде **L1-L4** и цисплатину (CDDP) на ћелијским линијама 4T1, CT26, MDA-MB-468, HCT116 и mMSC, одређене помоћу МТТ теста

	4T1	MDA-MD-468	CT26	HCT116	mMSC
C1	184,53±9,63	>500	404,98±5,41	320,99±5,65	468,82±3,73
C2	273,84±5,32	>500	360,42±6,41	233,50±5,56	253,70±9,1
C3	280,94±7,73	458,83±8,21	470,62±4,46	175,82±3,01	>500
C4	290,51±9,29	>500	345,39±6,93	223,24±8,01	447,62±4,36
L1	>500	298,34±7,43	>500	189,89±3,03	431,27±8,97
L2	272,96±8,85	99,61±1,41	259,71±8,55	61,54±1,91	247,47±3,03
L3	54,06±4,49	70,69±0,53	90,15±3,90	18,96±2,57	47,40±0,23
L4	46,86±0,09	<7,8	56,46±1,05	<7,8	23,54±1,75
CDDP	16,96±1,18	13,09±0,91	20,46±1,05	18,34±0,36	13,62±1,64

4.6. Процена механизма антитуморске активности комплекса **C4** и лиганда **L4** на ћелијама хуманог колоректалног карцинома (HCT116) *in vitro*

Детаљном анализом антитуморског потенцијала испитиваних комплекса и лиганда утврђено је да лиганд **L4** испољава најизраженији цитотоксични дозно-завистан ефекат, посебно на ћелијама хуманог колоректалног карцинома. С друге стране, комплекс **C4** показао је значајну селективност, с обзиром на то да је његова токсичност била знатно нижа према здравим mMSC у поређењу са ефектима на ћелијске линије карцинома. С обзиром на ове запажене ефекте, следећи корак у истраживању био је усмерен на испитивање механизма који су у основи антитуморске активности комплекса **C4** и лиганда **L4**. У фокусу истраживања су били њихов утицај на тип ћелијске смрти, као и утицај на пролиферацију и динамику ћелијског циклуса туморских ћелија.

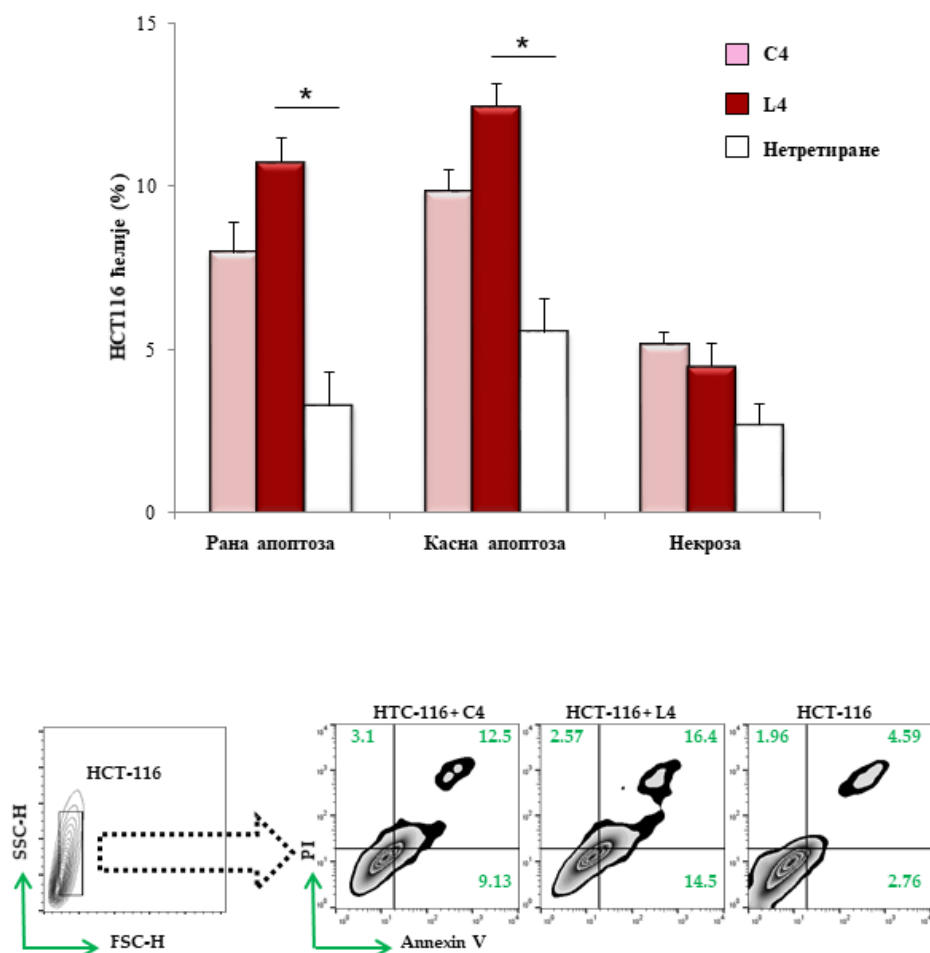
4.6.1. Испитивање утицаја **C4** комплекса и **L4** лиганд на процентуалну заступљеност HCT116 ћелија у раној али и касној фази апоптозе

Апоптоза, позната и као програмирана ћелијска смрт, представља витални процес у развоју и одржавању ткивне хомеостазе, којим се селективно уклањају оштећене, нефункционалне или потенцијално штетне ћелије, без утицаја на здраво суседно ткиво. Овај механизам се активира у специфичним физиолошким и патолошким стањима, као што су имунолошке реакције и туморска супресија. У терапијском контексту, апоптоза омогућава циљано уништавање малигних ћелија и тиме представља кључни механизам у лечењу карцинома, јер обухвата елиминацију болесних ћелија уз минималан утицај на здраво ткиво (243).

У склопу истраживања антитуморских својстава синтетисаних молекула, испитана је способност комплекса **C4** и лиганда **L4** да индукују апоптозу у ћелијама карцинома, чиме би се потенцијално потврдила њихова употребљивост у терапији малигних обољења. Испитивање је обављено применом анализе проточном цитометријом, која је омогућила

прецизну идентификацију апоптотских ћелија употребом *Annexin V FITC* и пропидијум-јодида. *Annexin V FITC* се везује за фосфатидилсерин, липид који се екстернализује на површини мембране ћелија у раним фазама апоптозе, док пропидијум-јодид продире у ћелије само у каснијим фазама апоптозе или некрозе, чиме омогућава разликовање ових фаза (244).

Резултати, приказани на Фигури 10, указују на снажан апоптотски ефекат комплекса **C4** и лиганда **L4** на ћелије колоректалног карцинома НСТ116. Након 24 сата третмана овим једињењима, примећено је повећање ћелија у касној фази апоптозе у поређењу са нетретираним ћелијама. Поред тога, велики део НСТ116 ћелија био је у раним стадијумима апоптозе након третмана, што указује на брз одговор ових ћелија на третман. Укупно гледано, проценат НСТ116 ћелија са карактеристикама касне фазе апоптозе био је значајно већи након 24-часовног третмана овим једињењима у поређењу са нетретираном контролном групом ($p < 0,05$), како је приказано на Фигури 10А. Ова запажања потврђују да комплекс **C4** и лиганд **L4** могу ефективно активирати апоптотски пут у карциному НСТ116, што указује на њихов потенцијал као селективних агенаса за индукцију ћелијске смрти у туморским ћелијама, чиме би могли представљати обећавајуће молекуле за будућа истраживања у области терапије карцинома.



Фигура 10. Анализа индукције апоптозе у НСТ116 ћелијама третираним **C4** комплексом и **L4** лигандом

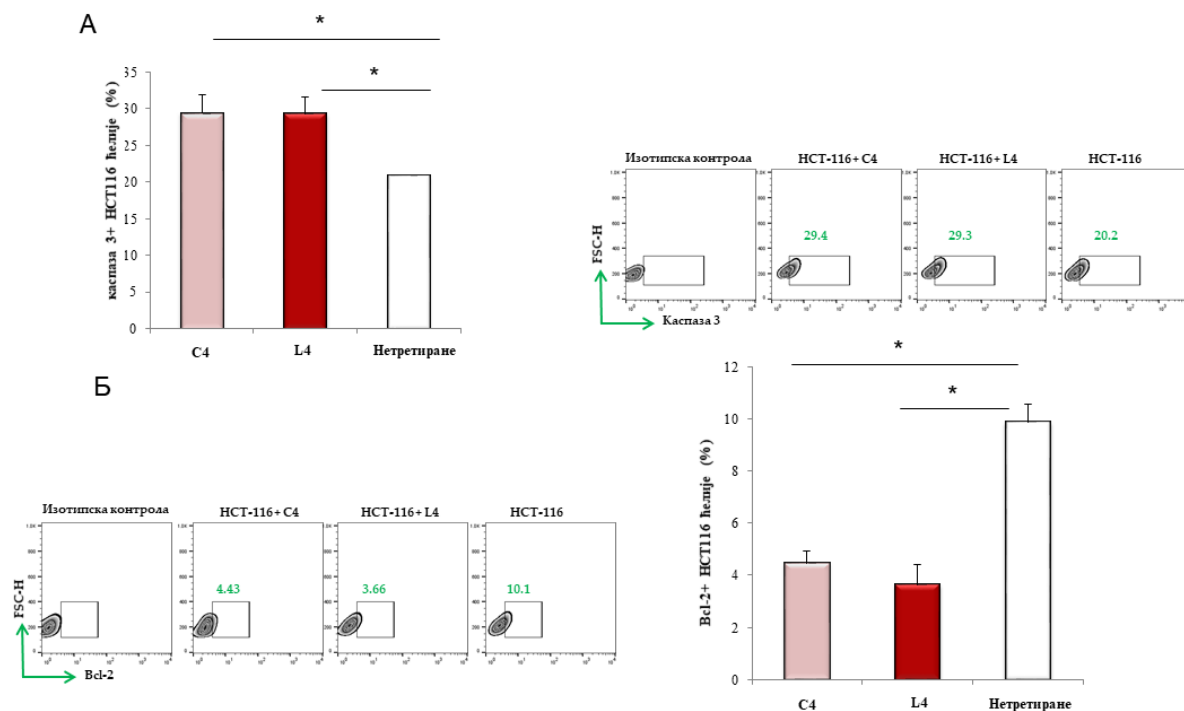
Овај приказ омогућава преглед апоптотских ефеката које изазивају **C4** комплекс и **L4** лиганд на ћелије хуманог колоректалног карцинома. Апоптоза у HCT116 ћелијама, које су биле нетретиране, третиране **C4** комплексом и третиране **L4** лигандом, процењивана је проточном цитометријом применом двоструког бојења *Annexin V (FITC)* и пропидијум-јодидом. Репрезентативни *FACS* плотови приказују расподелу виталних (*AnnV⁻PI⁻*), раних апоптотских (*AnnV⁺PI⁻*), касних апоптотских (*AnnV⁺PI⁺*), и некротичних (*AnnV⁻PI⁺*) HCT116 ћелија. Подаци су приказани као средње вредности $\pm$ SEM (стандардна грешка средње вредности) из три независна експеримента, при чему $*p < 0.05$ означава значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

4.6.2. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на процентуалну заступљеност каспаза 3 + HCT 116 ћелија и смањују проценат Bcl-2 + HCT116 ћелија

Спољашњи пут апоптозе се иницира активирањем рецептора смрти на ћелијској мембрани, који, након стимулације, доводе до каскадне активације каспаза, међу којима је каспаза-3 одговорна за разградњу ћелијских компоненти и индукцију програмиране ћелијске смрти (245). Насупрот томе, унутрашњи или митохондријски пут апоптозе функционише као одговор на неравнотежу између проапоптотских и антиапоптотских протеина, међу којима је Bcl-2 један од кључних антиапоптотских регулатора. Bcl-2 одржава интегритет митохондријске мембране, спречавајући ослобађање цитохрома C, што је критичан корак у индукцији апоптозе. Недостатак равнотеже у нивоу Bcl-2 може изазвати повећану пропустљивост митохондријске мембране, што омогућава ослобађање цитохрома C, који затим активира каспазу-3 и покреће процес апоптозе (246).

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације показали су да третман HCT116 ћелија IC₅₀ концентрацијама комплекса **C4** и лиганда **L4** доводи до значајног смањења експресије Bcl-2 позитивних ћелија, што указује на редукцију антиапоптотске заштите у овим ћелијама (како је приказано на Фигури 11). Ово смањење сугерише да и **C4** и **L4** делују на унутрашњи пут апоптозе, нарушавајући митохондријску стабилност. Истовремено, примећено је изражено повећање процента HCT116 ћелија са експресијом активне каспазе-3 након третмана овим једињењима, што указује на значајну активацију апоптотских путева (Фигура 11). Ови резултати указују да комплекс **C4** и лиганд **L4** промовишу апоптозу у ћелијама карцинома и преко спољашњег и кроз унутрашњи пут апоптозе, повећавајући проценат апоптотских ћелија у различитим стадијумима.

Ови резултати подржавају хипотезу да **C4** и **L4** имају потенцијал да делују као ефикасни агенси за индукцију апоптотске смрти у туморским ћелијама и сугеришу могућност њихове примене у терапијским стратегијама за елиминацију канцерогених ћелија са минималним ефектом на здраве ћелије.



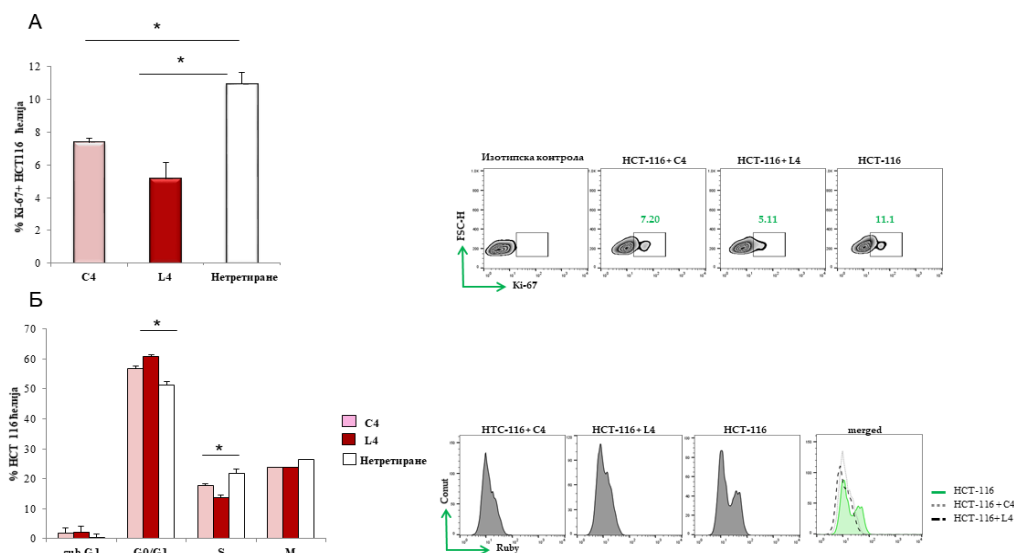
Фигура 11. Анализа експресије Bcl-2 и каспазе-3 у НСТ116 ћелијама третираним **C4** комплексом и **L4** лигандом

На Фигури 11 приказан је детаљан преглед експресије есенцијалних молекула повезаних са апоптотским механизмима, како спољашњег тако и унутрашњег пута, које индукују **C4** комплекс и **L4** лиганд у ћелијама хуманог колоректалног карцинома. Фигура 11А илуструје експресију Bcl-2 протеина, која је испитана применом проточне цитометрије, уз репрезентативне FACS плотове који приказују ниво експресије Bcl-2 у НСТ116 ћелијама које нису третиране, као и у оним третираним **C4** комплексом и **L4** лигандом у току 24 сата. Фигура 11Б приказује експресију каспазе-3, такође путем проточне цитометрије, уз FACS плотове који приказују проценат каспазе-3 позитивних ћелија у нетретираним НСТ116 ћелијама и у оним третираним **C4** комплексом и **L4** лигандом. Подаци су представљени као средње вредности $\pm$ SEM (стандардна грешка средње вредности) изведене из три независна експеримента, при чему $*p < 0.05$ указује на статистички значајну разлику између третираних и нетретираних ћелија.

4.6.3. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на проценат Ki-67⁺ НСТ116 ћелија и заустављају ћелијски циклус у G0/G1 фази

Протеин Ki-67 је добро познати маркер повезан са пролиферацијом ћелија и сматра се једним од кључних показатеља ћелијске активности. Ki-67 је протеин који се везује за ДНК и присутан је искључиво у ћелијама које пролазе кроз циклус деобе, док је одсутан у мирним, неподељеним ћелијама (фаза G0). Његова експресија је ограничена на активне фазе ћелијског циклуса, укључујући G1, S, G2 и M фазе, што Ki-67 чини поузданим индикатором пролиферативне активности. Повећана експресија Ki-67 обично указује на високу стопу пролиферације, што га чини непроцењивим алатом за процену пролиферативног статуса туморских ћелија, али и за процену ефикасности антиканцерогених лекова који имају за циљ да успоре или зауставе ћелијску деобу (247).

У оквиру ове дисертације испитивани су антипролиферативни ефекти комплекса **C4** и лиганда **L4** на НСТ116 ћелијама карцинома дебелог црева. Коришћено је мерење нивоа експресије Ki-67 као маркера ћелијске деобе, с обзиром на његову значајну улогу у одређивању пролиферативне способности ћелија. Резултати су показали значајно смањење експресије Ki-67 у НСТ116 ћелијама третираним комплексом **C4** и лигандом **L4** у поређењу са нетретираним контролним ћелијама, што је визуелно приказано на Фигури 12А. Овај пад у експресији Ki-67 је важан индикатор смањења пролиферативне активности, чиме се истиче потенцијална ефикасност комплекса **C4** и лиганда **L4** у сузбијању раста туморских ћелија и могуће спречавање даљег ширења карцинома.



Фигура 12. Ефекти комплекса **C4** и лиганда **L4** на експресију Ki-67 и динамику ћелијског циклуса у НСТ116 ћелијама

На Фигури 4. приказан је утицај комплекса **C4** и лиганда **L4** на експресију протеина Ki-67 и расподелу ћелијског циклуса у НСТ116 ћелијама карцинома. Панел А приказује репрезентативне FACS плотове са нивоима експресије Ki-67 у НСТ116 ћелијама након 24 сати третмана овим једињењима. Панел Б наглашава утицај ових једињења на расподелу ћелијског циклуса, упоређујући нетретиране и третиране НСТ116 ћелије колоректалног карцинома.

Додатно, у оквиру ове дисертације испитивано је заустављање ћелијског циклуса у НСТ116 ћелијама колоректалног карцинома након третмана једињењима **C4** и **L4**, са циљем бољег разумевања ћелијских механизма њиховог антиканцерогеног деловања. Током 24-часовне изложености овим једињењима, новосинтетисани **C4** комплекс и **L4** лиганд су показали способност да инхибирају ћелијски циклус у G0/G1 фази у третираним ћелијама, тако што повећавају проценат ћелија у G0/G1 фази, као што је приказано на Фигури 12Б. Ова инхибиција, највероватније, произилази из специфичних молекулских промена унутар ћелија карцинома након третмана.

Такође, забележено је значајна редукција процента ћелија у S фази, која је од критичног значаја за репликацију ДНК, што је додатно приказано на Фигури 12Б. Ова редукција указује на ефикасност **C4** и **L4** у ометању прогресије ћелијског циклуса и онемогућавању даље пролиферације.

4.6.4. Испитивање утицаја C4 комплекса и L4 лиганда на процентуалну заступљеност циклин D3 + HCT 116 ћелија

Циклини играју кључну улогу у регулацији ћелијског циклуса, представљајући породицу протеина који омогућавају контролисану прогресију ћелија кроз фазе деобе. Они остварују ову функцију активирањем киназа зависних од циклина CDK, чиме координишу прелазак ћелија из једне фазе циклуса у другу и осигуравају да се ћелијска деоба одвија у тачно дефинисаним условима (248). Посебно значајну улогу међу циклинима има циклин D3, који делује као онкоген и један је од примарних унутрашњих регулатора ћелијског циклуса. Циклин D3 има важну улогу у преласку ћелија из G1 у S фазу, што је пресудан корак за синтезу ДНК и пролиферацију ћелија. Као такав, он је од изузетног значаја у биологији тумора, јер су поремећаји у његовој регулацији повезани са неконтролисаном пролиферацијом, што доприноси развоју карцинома (249).

У оквиру ове дисертације, испитиван је утицај комплекса C4 и лиганда L4 на експресију циклина D3 у HCT116 ћелијама карцинома дебелог црева. Ћелије су биле третиране IC₅₀ концентрацијама ових једињења у трајању од 24 сата, након чега је измерена експресија циклина D3 како би се проценио њихов антипролиферативни потенцијал. Резултати, приказани на Фигури 13, указали су на смањење експресије циклина D након третмана, мада ово смањење није достигло ниво статистичке значајности. Смањена експресија циклина D3 сугерише потенцијални механизам деловања ових једињења, при чему се инхибиција циклина D3 може повезати са успоравањем ћелијског циклуса, а тиме и са смањењем пролиферативне активности карцинома.



Фигура 13. Ефекти комплекса C4 и лиганда L4 на ћелијски циклус у HCT116 ћелијама

На Фигури 13 приказан је утицај комплекса C4 и лиганда L4 на експресију циклина D у HCT116 ћелијама карцинома. Ови резултати добијени проточном цитометријом, представљени су као средња вредност $\pm$ SEM, на основу података из три независна експеримента. Статистичка значајност је означена са $*p < 0,05$, чиме су истакнуте значајне разлике у експресији ових протеина између третираних ћелија и нетретиране контролне групе.

4.7. Испитивање антимикробне активности

У оквиру ове докторске дисертације испитивана је и антимикробна активност синтетисаних лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса, као и референтног антибиотика тетрациклина и антимикотика флуконазола, а добијени резултати приказани су у Табелама 5, 6 и 7. Растварач (10% DMSO) није имао инхибиторни ефекат на раст тестираних микроорганизама, чиме је осигурана специфичност испитиваних

једињења. Интензитет антимикробног дејства значајно је варирао у зависности од врсте микроорганизма и типа једињења, што указује на селективност ових супстанци према одређеним патогенима. Генерално тестирана једињења су показала селективну и умерену активност. МИС вредности за лигане су у распону од 15,63 до >1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, док су за комплексе од 62,50 до >1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Табела 5. Антимикробна активност лиганада **L1-L4**

Супстанце	L1		L2		L3		L4	
Тестирани сојеви	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>Bacillus subtilis</i>	500	1000	250	1000	62,5	500	15,63	500
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	500	1000	500	500	62,5	125	31.25	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	500	1000	500	1000	125	1000	250	500
<i>Escherichia coli</i>	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	500	1000	500	1000	250	1000	62,5	1000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	250	250
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	500	500	500	500	500	500	62,5	250
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>1000	>1000	500	1000	250	250	125	125

MIC- минимална инхибиторна концентрација; MBC- минимална микробицидна концентрација.

Табела 6. Антимикробна активност испитиваних комплекса

Супстанце	C1		C2		C3		C4	
Тестирани сојеви	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>Bacillus subtilis</i>	500	>1000	500	>1000	500	>1000	500	1000
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	250	500	250	500	250	500	125	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000
<i>Escherichia coli</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	250	1000	62,5	500	250	500	500	1000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Salmonella enterica</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	250	500	250	500	250	1000	500	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000	>1000

MIC- минимална инхибиторна концентрација; MBC- минимална микробицидна концентрација.

Табела 7. Антимикробна активност лекова коришћених као позитивне контроле

Супстанце	Флуконазол		Тетрациклин	
Тестирани сојеви	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>Bacillus subtilis</i>	/	/	0,11	1,95
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	/	/	1,95	15,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	/	0,98	15,63
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	/	/	0,22	3,75
<i>Escherichia coli</i>	/	/	15,63	31,25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	/	/	15,63	31,25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	/	/	125	125
<i>Salmonella enterica</i>	/	/	15,63	31,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	31,25	1000	/	/
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	62,5	1000	/	/
<i>Saccharomyces boulardii</i>	7,81	31,25	/	/

MIC- минимална инхибиторна концентрација; MBC- минимална микробицидна концентрација.

Комплекси **C1** и **C2** испољили су бољу антимикуробну активност у поређењу са одговарајућим лигандима **L1** и **L2**, што указује на потенцијално побољшање антибактеријских својстава присуством паладијум(II) јона. Међутим, код комплекса **C3** и **C4**, лиганди **L3** и **L4** показали су супериорнију активност у односу на своје комплексе. Лиганд **L4** се показао као најперспективнији у сузбијању раста Грам-позитивних бактерија, нарочито *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Bacillus subtilis* (и стандардни и клинички сој). Поред тога, **L4** је исказао добру активност против квасница, са MIC вредностима у распону од 62,50 до 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, при чему се *Rhodotorula mucilaginosa* показала као најосетљивија на овај лиганд, што је слично дејству позитивне контроле, флуконазола. Уочена је значајна разлика у ефикасности тестираних једињења према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама. Највећи антимикуробни ефекат према Грам-негативним бактеријама забележен је код комплекса **C2** и лиганда **L4** против *E. coli* ATCC 25922, са MIC вредностима од 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, док је утицај на друге Грам-негативне сојеве био углавном низак (Табела 5). Ови резултати указују на потенцијалну селективну употребу ових једињења у циљу антимикуробне терапије, посебно против Грам-позитивних патогена и одређених гљивичних сојева, уз могућност додатног модификовања за постизање ширег спектра активности.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Антитуморска својства платина(II) и паладијум(II) комплекса

Због рапидног повећања броја пацијената са малигним обољењима, истраживање нових антитуморских лекова постаје приоритет у савременој медицини. Почети развоја антитуморске терапије повезани су са открићем антитуморског ефекта цисплатине, што наглашава значај испитивања цитотоксичке активности хемијских модификација комплекса платине, као и комплекса других прелазних метала. Ово је утицало на брз развој медицинске хемије, нарочито у области дизајнирања и развоја лекова. Главни разлог за овај напредак је потреба за новим потенцијалним лековима или модификацијом већ постојећих једињења различитим структурним променама како би се постигао жељени профил биолошке активности уз минималну токсичност и проблема са резистенцијом, као и што већим степеном селективности. Због структурне сличности између комплекса платине(II) и паладијума(II), постоји велики интерес за проучавање комплекса паладијума(II) као потенцијалних антиканцерских лекова (250, 251). Комплекси паладијума су у прошлости показивали мању антитуморску активност у *in vitro* тестовима у поређењу са комплексима платине(II), што је могло бити последица веће нестабилности паладијума(II) у односу на платину(II) (211, 252, 253). Међутим, избор лиганда игра кључну улогу у одређивању антиканцерогеног потенцијала комплекса, јер лиганди могу значајно утицати на хемијску реактивност и липофилност комплекса (254). Неколико паладијумових комплекса(II) показало је високу цитотоксичност, која се може упоредити са ефектима цисплатине (255, 256). Због ових својстава, наставља се тенденција да се синтетишу нови комплекси паладијума(II), а самим тим и истраживање њихове потенцијалне употребе. На основу резултата досадашњих истраживања, определи смо се за коришћење лиганда *pdda*-типа за синтезу нових комплекса паладијума(II) који би показали потенцијалну биолошку активност и као такви касније нашли фармаколошку примену.

5.2. Карактеризација новосинтетисаних лиганда и комплекса и испитивање интеракција са биолошки важним молекулима

Награђени лиганди и комплекси окарактерисани су елементалном микроанализом, инфрацрвеном и нуклеарно-магнетно-резонанционом спетроскопијом. Резултати елементалних анализа показали су да су израчунате вредности у сагласности са нађеним вредностима, чиме су потврђене претпостављене структуре за лиганде и за комплексе. На основу резултата инфрацрвене спетроскопије утврђено је да се диалкил естри (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил) сирћетне киселине дихлорхидрата координују за паладијум(II) јон преко два атома азота из пропилендиаминског моста. Положај и изглед сигнала у ^1H и ^{13}C NMR спектрима потврђују структуру добијених лиганда и одговарајућих паладијум(II) комплекса, као и начин координације. Флуоресцентна спетроскопија је коришћена за испитивање интеракције са ДНК, као и својстава везивања испитиваних комплекса за хумани серум албумина. Сви комплекси су показали висок афинитет према ХСА протеину, са релативно високим константама везивања. Студије интеракције са ЦТ-ДНК показале су да се паладијум(II) комплекси везују за ДНК, стога су вршена и мерења вискозности. Ова мерења указују на то да не долази до интеркалације између база ДНК, што сугерише да се везивање одвија у мањим или већим жлебовима молекула ДНК.

5.3. Антитуморски потенцијал лиганда L1-L4 и комплекса C1-C4 *in vitro*

5.3.1. Утицај комплекса C4 и лиганда L4 на вијабилност туморских ћелија

МТТ тестом процењена је виталност ћелија након третмана различитим концентрацијама синтетисаних лиганда и њихових паладијум(II) комплекса. МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид је жути кристал који се у метаболички активним ћелијама редукује у љубичасте кристале формаза. Пошто је митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа) активна само у живим ћелијама, редукција овог једињења у формазан је директно повезана са бројем живих ћелија. Овом техником се врши прецизно мерење утицаја на ћелијску пролиферацију и одређивање утицаја испитиваних супстанци на смањење виталности различитих ћелијских линија. Испитан је цитотоксични ефекат четири новосинтетизована лиганда **L1-L4**, као и њихових одговарајућих комплекса са паладијумом(II) **C1-C4**. Ово испитивање је спроведено на мишијим (4T1) и људским (MDA-MB-468) ћелијама карцинома дојке, као и на мишијим (CT26) и људским (HCT116) ћелијама колоректалног карцинома. Ћелије су биле изложене тестирањем комплексима током 24 сата, при концентрацијама од 7,8 до 500 μM . Резултати указују да и лиганди (**L1-L4**) и комплекси (**C1-C4**) поседују умерене цитотоксичне ефекте, смањујући виталност како у људским, тако и у мишијим туморским ћелијама. Такође, испитивана једињења су показала дозну зависност у погледу цитотоксичне активности против ћелија карцинома дојке (4T1, MDA-MB-468) и колоректалног карцинома (CT26, HCT116). Претходна истраживања су показала да комплекси паладијума(II) са естрима (S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидроксibenзил)) ацетатне киселине, такође показују дозно-зависну цитотоксичност према хуманим ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231), плућа (A549) и лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије (257). Идеалан лек треба да има минималан утицај на здраве ћелије или да покаже ниску цитотоксичност према здравим, малигно неизмењеним ћелијама. Зато је један од циљева нашег истраживања био да испитамо ефикасност комплекса паладијума(II) и да проценимо њихов утицај на нетуморске мезенхималне матичне ћелије (mMSC) *in vitro*. Сви тестирани лиганди и комплекси смањили су виталност не-туморских ћелија на дозно-зависни начин. Након 24-часовне инкубације, комплекс **C4** показао је нижи цитотоксични ефекат на mMSC при концентрацијама од 7,8 до 63,5 μM у поређењу са његовим ефектом на туморске ћелије, укључујући 4T1 и CT26 мишије туморске ћелије, као и MDA-MB-468 и HCT116 људске туморске ћелије. Смањена цитотоксичност комплекса **C4** према mMSC, уз његову способност да смањује виталност 4T1, MDA-MB-468, CT26 и HCT116 туморских ћелија, указује на потенцијалну селективну цитотоксичност овог новог комплекса према туморима. Ови резултати сугеришу да би комплекс **C4** могао бити мање токсичан, а више толерантан у живом организму. Истовремено, лиганд **L4** је показао минималне цитотоксичне ефекте на mMSC при нижим концентрацијама, у опсегу од 7,8 до 31,25 μM . Међутим, при вишим концентрацијама, забележен је значајан пад у проценту виталности mMSC.

У оквиру ове докторске дисертације, темељно је испитана цитотоксичност **C1-C4** комплекса и **L1-L4** лиганда процењивањем њихових полу-максималних инхибиторних концентрација (IC_{50}). IC_{50} представља концентрацију потребну за инхибирање 50% виталних ћелија. Процена је обухватила неколико ћелијских линија, укључујући 4T1, MDA-MB-468, CT26, HCT116, као и не-туморске мишије мезенхималне матичне ћелије (mMSC). Добијене вредности указују да лиганд **L4** има значајне цитотоксичне ефекте, у поређењу са осталим лигандима (**L1-L3**) и комплексима (**C1-C4**). С друге стране, цисплатина (CDDP), је показала снажнији цитотоксични ефекат на ове туморске ћелије у поређењу са **C1-C4** комплексима. Међутим, важно је напоменути да је цисплатина такође показала и већу цитотоксичност према мишијим мезенхималним матичним ћелијама. На основу резултата МТТ теста, комплекс **C4** и лиганд **L4** одабрани су за даља истраживања.

5.3.2. Утицај С4 комплекса и L4 лиганда на апоптотску смрт туморских ћелија

Након што смо утврдили да новосинтетисани комплекс **C4** и лиганд **L4** показују селективну цитотоксичну активност на ћелијске линије хуманог колоректалног карцинома, интересовало нас је на који начин остварују свој анти-туморски ефекат. Познато је да поремећаји у регулацији апоптозе играју кључну улогу у канцерогенези и резистенцији малигних ћелија на цитостатике (258). Због тога је циљ нових хемиотерапеутика да делују кроз стимулisaње апоптозе. С обзиром на то да смо утврдили да комплекс **C4** и лиганд **L4** имају изражену цитотоксичну активност, наш следећи корак био је да испитамо који је доминантни механизам ћелијске смрти који ова једињења индукују. Апоптоза је процес програмирање ћелијске смрти који се одвија на нивоу појединачне ћелије, без оштећења околних ћелијских структура и без изазивања запаљенских реакција (259). Управо због тога, стимулisaње апоптозе представља ефикасан приступ у лечењу карцинома. Апоптоза је праћена специфичним морфолошким променама (260). На почетку долази до губитка међућелијских веза, деградације цитоскелета и смањења волумена ћелије. Затим следи пикноза, након чега се јавља распад језгра (261). Молекул ДНК се фрагментира, ендоплазматични ретикулум се дилатира, а митохондрије ослобађају цитохром С (262). Плазма мембране се деформише, а на крају се формирају апоптотска тела која садрже делове цитоплазме са нетакнутим органелама и деловима нуклеуса. Ова апоптотска тела привлаче околне фагоците, попут макрофага и дендритских ћелија, које их ингестирају и разграђују у фаголизозомима. Очување интегритета ћелијске мембране спречава изливање ћелијског садржаја у околину, чиме се избегава запаљење у околном ткиву (263). Апоптоза је од суштинске важности за нормалан раст, развој и одржавање хомеостазе ткива. Она игра кључну улогу у ембрионалном развоју, процесу имплантације јајне ћелије и формирању неуронских синапси (264). Током каснијег живота, апоптоза омогућава уклањање кератиноцита који мигрирају ка површним слојевима коже, као и елиминацију аутореактивних Т и Б лимфоцита, као и ефекторских ћелија у завршним фазама имунског одговора (265). Овај процес је строго генетски контролисан и подразумева активну улогу ћелије, уз потрошњу енергије (266). Апоптоза има улогу да штити од развоја малигних тумора. Међутим, неке малигне ћелије су развиле механизме који им омогућавају да избегну овај процес и наставе да се деле. Најчешће се то дешава када дође до губитка р53 тумор супресорске функције (267). Такође, туморске ћелије могу повећати производњу молекула који спречавају апоптозу (нпр. Bcl-2, BclXL, BclX BclXS), или смањити ниво молекула који подстичу апоптозу (нпр. Бах, Bad, Bim, Bak, Bid) (268, 269). Bcl-2 је протеин који има значајну улогу у контроли унутрашњег пута апоптозе (270). Као што је поменуто, Bcl-2 је представник анти-апоптотских протеина. Ови протеини модулишу пропустљивост митохондријалне мембране спречавајући ослобађање цитохрома С, чиме регулишу ослобађање про-апоптотских молекула из интермембранског простора митохондрија у цитоплазму и следствено покретање апоптозе (271, 272). Овај протеин је главни представник своје фамилије и има значајну улогу у контролисању ћелијске смрти. Он формира хетеродимере са про-апоптотским протеинима и стабилизује мембрану митохондрија. Такође, димеризацијом са Бах протеином (енгл. *Bcl-2-associated X protein*), Bcl-2 инхибира иницијацију апоптозе (273). Показано је да је Bcl-2 високо експримиран у хистолошки добро диферентованим туморима, са минималном некрозом, што додатно потврђује његову улогу у инхибицији процеса апоптозе (274). Студија *Yang et al.*, сугерише да Bcl-2 подстиче настанак резистенције на цитостатике (275). Са друге стране, друга студија *Del Bufalo* и сарадника показује да Bcl-2 може повећати сензитивност на

хемиотерапију (276). Такође, естроген доприноси развоју резистенције малигних ћелија на хемотерапеутике, стимулишући експресију Bcl-2 молекула (277, 278). Овај стимулаторни ефекат се може објаснити већу отпорност ћелија на терапијске агенсе. Студије показују да се Bcl-2 повећано експримира током G1 фазе ћелијског циклуса, што за последицу има задржавање ћелија у G1 фази чиме се одлаже прелазак у S фазу (279, 280). Овај механизам је још једно објашњење развоја резистенције на хемотерапеутике, за које је познато да свој главни ефекат остварују у периоду S фазе. Инхибитори апоптозе (енгл. *Inhibitors of apoptosis*, IAPs) свој ефекат остварују везивањем за каспазе и следственом блокадом њихове активности. Најзначајнији чланови ове групе протеина су Smac DIABLO (енгл. *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases; Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) и Omi (енгл. *Outer Mitochondrial Membrane-associated protease*). Уз Bcl-2 и IAPs, и други протеини, као што су тумор супресорски протеин p53 и онкоген c-Мус, такође играју кључну улогу у процесу апоптозе (281-283). Молекул p53, још назван и чуваром генома, детектује оштећења молекула ДНК и покреће процес апоптозе посредован Fas рецепторима смрти, смањује експресију Bcl-2 анти-апоптотског молекула и следствено подстиче активацију апоптозе (284). Такође, c-Мус (енгл. *Cellular Myelocytomatosis oncogene*) индукује апоптотску смрт тако што појачава експресију и тиме и инхибира главни негативног регулатора p53, молекул означен као Mdm2 (енгл. *Mouse Double Minute 2 homolog*) (285). Способност комплекса **C4** и лиганда **L4** да индукују апоптозу у туморским ћелијама тестирана је методом проточне цитометрије, уз коришћење специфичних боја као што су Annexin V FITC и пропидијум јодид. Антикоагуланс хуманог порекла, Annexin V, је Ca²⁺ зависни протеин са масом од 35-36 kDa везује се за фосфатидилсеринске остатке који се појављују на спољашњој страни ћелијске мембране у раним фазама апоптозе (286). С друге стране, пропидијум јодид може да продре и обоји ћелије само у каснијим фазама апоптозе или током некрозе (286). Извртање ћелијске мембране доводи до излагања фосфатидилсерина на њеној спољашњој површини, што служи као сигнал за фагоцитозу, односно као "eat me" знак који привлачи фагоците (252). Резултати теста апоптозе показали су значајан број ћелија НСТ116 које су ушле у касну апоптозу након 24-часовног третмана комплексом **C4** и лигандом **L4**, што је указало на јасну индукцију апоптозе у туморским ћелијама. Такође, примећено је да је значајан проценат НСТ116 ћелија прошао кроз почетне фазе апоптозе након ових третмана, у поређењу са нетретираним ћелијама. Ови резултати су у складу са претходним истраживањима која су показала да комплекси паладијума(II) поседују потенцијал да индукују апоптозу у канцерогеним ћелијама (287). Процес апоптозе покрећу цитосолни ензими- каспазе (288). Каспазе су високо специфичне протеазе које се у ћелији синтетишу као неактивни прекурсори, прокаспазе. Ове прокаспазе се активирају протеолитичким цепањем, што покреће неповратну протеазну каскаду. Једном активирана, каспаза иницира активност других каспаза, чиме појачава апоптотски сигнал. Каспазе се деле на иницијаторске (каспаза 2, 8, 9 и 10) и ефекторске (каспаза 3, 6 и 7). Ови ензими делују на кључне регулаторе апоптозе, као и ензиме који контролишу ћелијски циклус или су укључени у поправку оштећеног молекула ДНК (289). Апоптоза може бити индукована на више начина, међутим генерално се сматра да су основни путеви активације спољашњи и унутрашњи пут (290, 291). Молекули који су укључени у један сигнални пут могу активирати и други сигнални пут, чиме се повећава ефикасност процеса апоптозе (262). Спољашњи пут апоптозе покреће се када лиганди директно везују рецепторе на спољашњој мембрани ћелије, који су познати као рецептори смрти: TNF (енгл. *Tumor Necrosis Factor*), Fas (енгл. *First apoptosis signal receptor*), CD40 (енгл. *Cluster of Differentiation 40*) и TRAIL (енгл. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) рецептори. Ова интеракција између лиганда и рецептора активира регрутацију адаптерних протеина и формирање DISC (енгл. *Death Inducing Signalling*

Complex). Формирањем овог комплекса активирају се каспазе 8 и 10 из својих неактивних облика, што доводи до активације ефекторске каспазе-3, која затим покреће апоптозу (292-294). Каспаза-3 је укључена у протеолитичкој разградњи ћелијских компоненти и органела, може је активирати било која иницијаторска каспаза. Истраживања су показала да каспаза-3 активира CAD ендонуклеазе (енгл. *Caspase-Activated Dnase*), које су нормално потиснуте инхибитором ICAD (енгл. *Inhibitor of Caspase-Activated Dnase*). У ћелијама које пролазе кроз апоптозу, каспаза-3 одваја ICAD од CAD, чиме се ослобађа CAD, који затим разграђује хромозомску ДНК и следствене кондензације хроматина. Поред тога, каспаза-3 узрокује реорганизацију цитоскелета и дезинтеграцију ћелије у апоптска тела (295). Насупрот томе, унутрашњи или митохондријални пут се активира приликом дисбаланса између про-апоптотских и анти-апоптотских молекула. Митохондrije играју кључну улогу у преношењу апоптотских сигнала пореклом из ћелије, као последица оксидативног стреса, оштећења ДНК, недостатака раста, нутријената или ефеката хемиотерапеутских агенаса (295, 296). Ови сигнали повећавају пропустљивост митохондријалне мембране, што доводи до ослобађања про-апоптотских протеина, као што је цитохром С у цитосол. Ослобођени цитохром С се везује за адаптерни протеин Аraf-1 (енгл. *Apoptosis Protease-Activating Factor 1*), који даље преводи неактиван облик прокаспазу-9 у активiranу каспазу-9. Ова активација покреће каскаду апоптозе, што даље активира каспазу-3, последњу у низу каспаза. Каспаза-3 затим цепа актинске филаменте цитоскелета, изазивајући типичне морфолошке промене ћелије (297).

Резултати у оквиру ове дисертације показују да је третман НСТ116 ћелија комплексом **C4** и лигандом **L4**, довео до значајног смањења броја Bcl-2 позитивних НСТ116 ћелија у поређењу са контролним нетретираним ћелијама. Насупрот томе, примећено је значајно повећање процента каспаза-3 позитивних ћелија. Третман **C4** комплексом и **L4** лигандом резултирао је повећањем броја туморских ћелија у обе фазе апоптозе (и ране и касне), као и повећаним процентом каспазе-3 позитивних туморских ћелија, док је истовремено дошло до смањења експресије анти-апоптотског молекула Bcl-2. Ови резултати су показали да комплекс **C4** и лиганд **L4** могу потенцијално покренути смрт туморских ћелија активацијом апоптозе. Слични резултати су добијени и у другим истраживањима, као што је студија *Espino J.* и сарадника (298). Ово подржава претпоставку да комплекси паладијума(II) имају потенцијал да инхибирају антиапоптотске молекуле као што је Bcl-2, чиме подстичу апоптозу у туморским ћелијама.

5.3.3. Испитивање утицаја **C4** комплекса и **L4** лиганда на пролиферацију ћелија хуманог колоректалног карцинома

Ћелијски циклус је прецизно координисан процес који обухвата раст и деобу ћелија. Он се састоји из неколико фаза: G1 (припремна фаза), S (фаза синтезе ДНК), G2 (друга припремна фаза) и M (митоза, фаза деобе ћелије). У S-фази се одвија репликација ДНК, што доводи до стварања два комплетна сета ДНК. У M-фази, ћелија се дели и ствара две генетски идентичне ћерке ћелије, чиме се циклус завршава (299). Између фаза синтезе и деобе, постоје фазе раста и припреме: G1 и G2. G1 фаза је припремна фаза у којој се изводе важни процеси као што су експресија гена и синтеза протеина који су неопходни за раст ћелије и припрему за S фазу. Ову фазу највише контролишу екстраћелијски сигнали као што су фактори раста, али и онкогени и тумор супресорски гени. У нормалним ћелијама, ова фаза зависи од екстраћелијских сигнала, док туморске ћелије често показују мању зависност од њих (300). Ki-67, пролиферацијски индекс који се користи као маркер активно пролиферишућих ћелија и широко се примењује за процену пролиферативне активности, посебно у контексту туморских тумора (301). У питању је

нуклеарни антиген и ДНК везујући протеин који је везан за хетеро- и еухроматином. Ген за Ki-67 је локализован на дугом краку 10. хромозома (10q25) (302). Присутан је у пролиферативним фазама ћелијског циклуса, укључујући G1, S, G2 и M фазе, али се не налази у фази мировања (G0). Ниво експресије Ki-67 је директно повезан са стопом ћелијске пролиферације, што га чини важним показатељем активности деловања туморских ћелија и ефикасности терапије (303, 304).

У оквиру ове дисертације анализирани су ефекти паладијум(II) комплекса **C4** и лиганда **L4** на пролиферативну активност ћелија HCT116 мерењем нивоа експресије Ki-67. Резултати су показали значајно смањење нивоа Ki-67 позитивних HCT116 ћелија које су третиране испитиваним једињењима **C4** и **L4**, указујући на значајан пад у процесу пролиферације ћелија. Овакав пад у експресији Ki-67 истиче потенцијал ових супстанци да инхибирају раст туморских ћелија, што сугерише да комплекс **C4** и лиганд **L4** могу деловати као ефикасни антипролиферативни агенси. Слични резултати су добијени и у другим истраживањима која су се бавила применом паладијум(II) комплекса са бензодиазинским лигандима, где је такође забележено значајно смањење броја Ki-67 позитивних ћелија, што додатно потврђује антипролиферативни ефекат ових комплекса на различите ћелијске линије (305). Да би се боље разумели молекулски механизми који стоје иза антитуморских ефеката **C4** комплекса и **L4** лиганда, испитиван је утицај ових супстанци на заустављање ћелијског циклуса. У оквиру ове дисертације, ћелије HCT116 су третиране **C4** комплексом и **L4** лигандом током 24 сата, при чему су оба испитивана једињења ефикасно индукована заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази. G0/G1 фаза је важна у контроли раста ћелија, јер у њој долази до припреме ћелија за подељеност и репликацију ДНК. Прелазак у ову фазу може бити последица молекулских промена које су се десиле у туморским ћелијама након третмана са испитиваним једињењима **C4** и **L4**, што подразумева успоравање или потпуно блокирање раста и деобе ћелија. Смањење броја ћелија које су се нашле у S фази, која је одговорна за репликацију ДНК, такође потврђује да једињења **C4** и **L4** успевају да блокирају напредовање ћелијског циклуса. Ова запажања су у складу са сличним истраживањима која су показала да паладијум(II) комплекси са дериватима фенилаланина такође доводе до заустављања циклуса у G0/G1 фази, што указује на потенцијал ових супстанци у блокирању туморског раста (306).

Ћелијски циклус регулишу три главне групе протеина: циклин-зависне киназе CDK, циклини и инхибитори циклин зависних киназа. CDK су ензими који фосфорилишу интрацелуларне протеине који иницирају или регулишу главне догађаје у ћелијском циклусу и активирају их, а активност циклин-зависних киназа варира у зависности од фазе ћелијског циклуса (307). Да би постигле активацију, CDK морају бити повезане са циклинима, који су протеини чија експресија расте и опада у различитим фазама циклуса. Четири класе циклина (D, E, A, B) регулишу прелазак из једне фазе циклуса у другу, формирајући комплексе циклин-CDK. Активност ових комплекса може бити блокирана инхибиторима циклин-зависних киназа, који спречавају њихову активност. Ови механизми координишу раст и деобу ћелије, а дисрегулација овог процеса може довести до неконтролисаног раста, као што је случај у канцерогенези (308). Циклини класе D, посебно циклин D3, има функцију да омогући прелазак из G1 у S фазу ћелијског циклуса, чиме регулишу почетни корак у процесу репликације ДНК. Због овога је њихова регулација круцијална у канцерогенези. Абнормално високи нивои циклина D могу довести до неконтролисаног раста ћелија и развоја тумора (309).

У овој дисертацији, испитивали смо утицај **C4** комплекса и **L4** лиганда на експресију циклина D у HCT116 туморским ћелијама. Након 24 сата инкубације са IC₅₀

концентрацијама испитиваних супстанци експресија циклина D је била смањена, иако ова промена није била статистички значајна. Смањење експресије циклина D указује на потенцијални механизам деловања ових супстанци у инхибицији пролиферације ћелија, јер циклин D3 управља кључним процесом који омогућава прелазак из G1 у S фазу. Слична открића су забележена и у другим студијама, где су нови паладијум(II) комплекси са дериватима 2-аминотиазола такође смањили експресију циклина D (310). Ова открића додатно подржавају теорију да смањење циклина D представља заједнички механизам у антипролиферативним ефектима различитих паладијумских комплекса. Инхибицијом циклина D, може се постићи ефективна блокада напредовања ћелијског циклуса, чиме се спречава раст и деоба туморских ћелија.

Такође, ова истраживања показују да **C4** комплекс и **L4** лиганд имају потенцијал да ефикасно смање пролиферацију туморских ћелија, и то кроз неколико механизма, укључујући индукцију заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 фази, као и смањење експресије циклина D, што додатно наглашава потенцијал испитиваних једињења **C4** и **L4** као антипролиферативних агенаса у лечењу канцера.

5.4. Испитивање антимикробне активности лиганата L1-L4 и комплекса C1-C4

Резистенција микроорганизама на антибиотике постаје глобални проблем, а све већи број микроорганизама развија резистентност. Овај тренд доводи до све веће потребе за проналажењем нових антимикробних агенаса, уз паралелну потребу за превенцијом и контролом ширења резистентних сојева (311). Јони метала, поред своје улоге у бројним хемијским реакцијама унутар микроорганизама, показују значајан антимикробни ефекат тако што изазивају дисфункцију протеина, инхибирају активности ензима, стимулишу продукцију реактивних кисеоничних врста и слободних радикала, оштећују ћелијске мембране и нарушавају транспорт електрона у микроорганизмима (312). Јони метала, као и наночестице и метални комплекси који демонстрирају антимикробну активност, познати су као "металоантибиотици" и представљају перспективну, али још увек недовољно истражену групу потенцијалних кандидата за развој нових антибиотика (313). Резултати *in vitro* тестирања антимикробне активности синтетисаних лиганата и одговарајућих паладијум(II) комплекса, као и позитивних контрола- тетрациклин и флуконазол, представљени су у Табелама 5, 6 и 7. Као растварач је коришћен 10% диметилсулфоксид, који није показао инхибиторни ефекат на раст тестираних микроорганизама. Интензитет антимикробне активности варирао је у зависности од врсте микроорганизма и типа супстанци које су биле тестиране. Генерално, тестиране супстанце показују селективну и умерену активност. Минималне инхибиторне концентрације (MIC) за лиганде су биле у опсегу од 15,63 до $>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, док су за комплексе биле од 62,50 до $>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Комплекси **C1** и **C2** показују бољу антимикробну активност од својих лиганата **L1** и **L2**, док је у случају комплекса **C3** и **C4** ситуација обрнута, али разлике у дејству нису биле значајне. Лиганд **L4** показао је најбољи ефекат против Грам-позитивних бактерија као што су *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 и *Bacillus subtilis* (стандардни и клинички сој). Такође, исти лиганд је показао добру активност против квасница у концентрацијама од 62,50 до $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, а најосетљивији на његов утицај била је *Rhodotorula mucilaginosa*. Осетљивост је у опсегу који је сличан позитивној контроли са флуконазолом. Претходна истраживања потврђују да постоји разлика у дејству испитиваних супстанци на Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије (314-316). Ефекат на Грам-негативне бактерије је био слаб, с изузетком комплекса **C2** и лиганата **L4** који су имали MIC од $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ против *Escherichia coli* ATCC 25922. Друга истраживања такође су показала да неки лиганди и паладијум(II) комплекси имају јаку антибактеријску активност против *Escherichia coli*

(317, 318). Ранија истраживања су показала да неки паладијум(II) комплекси са алкил естрима (S,S)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропанске киселине имају значајну антифунгалну активност против патогених гљива као што су *Aspergillus flavus* и *Aspergillus fumigatus*. Као и у нашем истраживању, ови комплекси су такође показали умерену антибактеријску активност (319). Диалкил естри етилендиамин-*N,N'*-ди-S,S-(2,2'-добензил) ацетатне киселине и њихови комплекси платине(IV) показали су различит степен антимикуробне активности у зависности од тестираних врста, што се подудара са нашим резултатима. Ови лиганди су показали бољу активност против већине тестираних гљива у поређењу са одговарајућим комплексима платине(IV), што је упоредиво с нашим резултатима (320). Такође, комплекси платине(IV) су показали значајну или умерену активност против Грам-позитивних бактерија и ниску активност против Грам-негативних бактерија (320). Слично нашим налазима, утврђено је да паладијумови комплекси са различитим естрима етилендиамин или (S,S)-пропилендиамин као лигандима углавном показују ниже антимикуробне активности у поређењу са комерцијалним антибиотцима (317, 319).

6. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације синтетисана су четири нова лиганда **L1-L4** и њихови одговарајући паладијум(II) комплекси **C1-C4**. Награђени лиганди и комплекси окарактерисани су елементалном микроанализом, инфрацрвеном (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанцијом (^1H и ^{13}C NMR) спетроскопијом. Резултати елементалних анализа показали су да су израчунате вредности у сагласности са нађеним вредностима, чиме су потврђене претпостављене структуре за лиганде и за комплексе. На основу резултата инфрацрвене спетроскопије утврђено је да се диалкил естри (*S,S*)-пропилендиамин-*N,N'*-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил) сирћетне киселине дихлорхидрата координују за паладијум(II) јон преко два атома азота из пропилендиаминског моста. Према броју, положају и изгледу сигнала у ^1H и ^{13}C NMR спектрима потврђене су структуре добијених лиганда и одговарајућих паладијум(II) комплекса, као и начин координације. Флуоресцентна спетроскопија је коришћена за процену интеракције са ДНК и својстава везивања за протеине испитиваних комплекса. Сви комплекси показали су високи афинитет везивања за ХСА протеин, са релативно високим константама везивања. Студије интеракције са ЦТ-ДНК откриле су да се паладијум(II) комплекси везују за ДНК, при чему мерења вискозности указују на одсуство интеркалације између база ДНК, што сугерише везивање за мање или веће жлебове молекула ДНК.

У овој дисертацији испитани су и цитотоксични и антипролиферативни ефекти новосинтетисаних лиганда и комплекса на различитим ћелијским линијама, укључујући карциногене и здраве ћелије. Посебно је истакнут лиганд **L4**, који је показао значајну цитотоксичност према карциногеним ћелијама уз ниску токсичност према неканцерогеним ћелијама, што указује на његову потенцијалну селективност и ефикасност. Лиганд **L4**, као и комплекс **C4**, индуковали су апоптозу у НСТ116 ћелијама, што је потврђено повећаним бројем ћелија у раној и касној фази апоптозе, појачаном експресијом активне каспазе-3, и смањеном експресијом антиапоптотског протеина Bcl-2. Додатно, значајно смањење експресије Ki-67 и заустављање ћелијског циклуса у фази G0/G1 наглашавају потенцијал ових једињења за инхибицију пролиферације ћелија карцинома. Иако су добијени резултати обећавајући, потребна су даља *in vitro* и *in vivo* истраживања како би се у потпуности разумели механизми дејства, оптимизовала терапијска ефикасност и проценила безбедност употребе ових једињења. Ова будућа истраживања су кључна за могућу клиничку примену и развој ефикасних терапијских опција за лечење карцинома. Такође, у оквиру ове дисертације испитано је и антимикумно дејство ових једињења. Активност испитиваних једињења је варијала у зависности од врсте микроорганизма и типа супстанце. Генерално, тестирана једињења показала су селективну и умерену активност, при чему је лиганд **L4** показао најјаче антимикумно дејство према већини тестираних Грам-позитивних бактерија и гљивица. Поред тога, лиганд **L4** и комплекс **C2** показали су и добру активност против *E. coli* ATCC 25922, указујући на могућу примену у борби против одређених бактеријских инфекција.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024n;74(3):229-263.
3. Abancens M, Bustos V, Harvey H, McBryan J, Harvey BJ. Sexual Dimorphism in Colon Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:607909.
4. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(3):177-193.
5. Dragan M, Snezana ZP, Bozic Z. Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut", Serbian Cancer Registry. Malignant Tumours in Republic of Serbia 2020. Belgrade (RS): Institute of Public Health of Serbia; 2022.
6. Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg.* 2005;18(3):133-40.
7. Lewandowska A, Rudzki G, Lewandowski T, Strykowska-Góra A, Rudzki S. Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Cancer Control.* 2022;29:10732748211056692.
8. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, Boffetta P, Jenab M. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011;22(9):1958-1972.
9. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program: SEER Fact Sheets-Colon and Rectum Cancer. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> (accessed on 5 November 2024).
10. Burt R, Neklason DW. Genetic testing for inherited colon cancer. *Gastroenterology.* 2005;128(6):1696-716.
11. Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S, Garramone M, Crisci R. Diet and cancer. *Acta Biomed.* 2006;77(2):118-23.
12. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet.* 2010;376(9754):1741-50.
13. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 2003;348(17):1625-38.
14. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, Forbes A. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2004;126(2):451-9.
15. Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, Rothenberger DA, Virnig BA. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology.* 2005;128(4):819-24.
16. Hildebrand JS, Jacobs EJ, Campbell PT, McCullough ML, Teras LR, Thun MJ, Gapstur SM. Colorectal cancer incidence and postmenopausal hormone use by type, recency, and duration in cancer prevention study II. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(11):2835-41.
17. Offit K. Genetic prognostic markers for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000;342(2):124-5.
18. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberger D, Brooks D, Creasman W, Cohen C, Runowicz C, Saslow D, Cokkinides V, Eyre H; ACS Prostate Cancer Advisory Committee, ACS Colorectal Cancer Advisory Committee, ACS Endometrial Cancer Advisory Committee. American Cancer Society guidelines for the

- early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: update 2001--testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin.* 2001;51(1):38-75;
19. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer.* 2008;7(1):27-39.
 20. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002;30(2):227-32.
 21. Lefevre JH, Rodrigue CM, Mourra N, Bennis M, Flejou JF, Parc R, Tiret E, Gespach C, Parc YR. Implication of MYH in colorectal polyposis. *Ann Surg.* 2006;244(6):874-9;
 22. Airoidi M, Bartolini M, Fazio R, Farinatti S, Daprà V, Santoro A, Puccini A. First-Line Therapy in Metastatic, RAS Wild-Type, Left-Sided Colorectal Cancer: Should Everyone Receive Anti-EGFR Therapy? *Curr Oncol Rep.* 2024;26(11):1489-1501.
 23. Liebl MC, Hofmann TG. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(9):2125.
 24. Zhou XP, Loukola A, Salovaara R, Nystrom-Lahti M, Peltomäki P, de la Chapelle A, Aaltonen LA, Eng C. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2002;161(2):439-47.
 25. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010;31(2):31-8.
 26. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23(1-2):11-27.
 27. Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):5939-40.
 28. Dinarvand P, Davaro EP, Doan JV, Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, Lai J, Guzman MA. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(11):1382-1398.
 29. Roncucci L, Pedroni M, Mariani F. Attenuated adenomatous polyposis of the large bowel: Present and future. *World J Gastroenterol.* 2017;23(23):4135-4139.
 30. Peltomäki P, Nyström M, Mecklin JP, Seppälä TT. Lynch Syndrome Genetics and Clinical Implications. *Gastroenterology.* 2023;164(5):783-799.
 31. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2020;158(2):291-302.
 32. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg.* 2002;89(7):845-60.
 33. Tevini J, Eder SK, Huber-Schönauer U, Niederseer D, Streibinger G, Gostner JM, Aigner E, Datz C, Felder TK. Changing Metabolic Patterns along the Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. *J Clin Med.* 2022;11(3):721.
 34. Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(10):3039-45.
 35. Thirunavukarasu P, Talati C, Munjal S, Attwood K, Edge SB, Francescutti V. Effect of Incorporation of Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Levels Into AJCC Staging for Colon Cancer on 5-Year Survival. *JAMA Surg.* 2015;150(8):747-755.
 36. Gude SS, Veeravalli RS, Vejandla B, Gude SS, Venigalla T, Chintagumpala V. Colorectal Cancer Diagnostic Methods: The Present and Future. *Cureus.* 2023;15(4):e37622.

37. Hazhirkarzar B, Khoshpouri P, Shaghaghi M, Ghasabeh MA, Pawlik TM, Kamel IR. Current state of the art imaging approaches for colorectal liver metastasis. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2020;9(1):35-48.
38. Beets-Tan RGH, Lambregts DMJ, Maas M, Bipat S, Barbaro B, Curvo-Semedo L, et al. Magnetic resonance imaging for clinical management of rectal cancer: Updated recommendations from the 2016 European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology (ESGAR) consensus meeting. *Eur Radiol.* 2018;28(4):1465-1475. Erratum in: *Eur Radiol.* 2018;28(6):2711.
39. Ford AC, Veldhuyzen van Zanten SJ, Rodgers CC, Talley NJ, Vakil NB, Moayyedi P. Diagnostic utility of alarm features for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2008;57(11):1545-53.
40. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, Halling K, Frankel W, Jessup J, Kakar S, Minsky B, Nakhleh R, Compton CC; Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(10):1539-51.
41. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):837-52.
42. Winawer SJ, Flehinger BJ, Schottenfeld D, Miller DG. Screening for colorectal cancer with fecal occult blood testing and sigmoidoscopy. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(16):1311-8.
43. Levin B, Brooks D, Smith RA, Stone A. Emerging technologies in screening for colorectal cancer: CT colonography, immunochemical fecal occult blood tests, and stool screening using molecular markers. *CA Cancer J Clin.* 2003;53(1):44-55.
44. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med.* 2005;352(18):1851-60.
45. Järvinen HJ, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen LA, Peltomäki P, De La Chapelle A, Mecklin JP. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2000;118(5):829-34.
46. Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *N Engl J Med.* 2000;343(3):162-8.
47. Baik SH. Robotic colorectal surgery. *Yonsei Med J.* 2008;49(6):891-6.
48. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. *World J Gastrointest Surg.* 2023;15(4):495-519.
49. Parker JM, Feldmann TF, Cologne KG. Advances in Laparoscopic Colorectal Surgery. *Surg Clin North Am.* 2017;97(3):547-560.
50. Robicsek F. Development of the surgical stapling device. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;41(4):207-15.
51. Johnson PM, Porter GA, Ricciardi R, Baxter NN. Increasing negative lymph node count is independently associated with improved long-term survival in stage IIIB and IIIC colon cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(22):3570-5.
52. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(6):433-41.

53. Kashida H, Kudo SE. Early colorectal cancer: concept, diagnosis, and management. *Int J Clin Oncol*. 2006;11(1):1-8.
54. Fleshman J, Branda M, Sargent DJ, Boller AM, George V, Abbas M, Peters WR Jr, Maun D, Chang G, Herline A, Fichera A, Mutch M, Wexner S, Whiteford M, Marks J, Birnbaum E, Margolin D, Larson D, Marcello P, Posner M, Read T, Monson J, Wren SM, Pisters PW, Nelson H. Effect of Laparoscopic-Assisted Resection vs Open Resection of Stage II or III Rectal Cancer on Pathologic Outcomes: The ACOSOG Z6051 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(13):1346-55.
55. Stevenson AR, Solomon MJ, Lumley JW, Hewett P, Clouston AD, Gebiski VJ, Davies L, Wilson K, Hague W, Simes J; ALaCaRT Investigators. Effect of Laparoscopic-Assisted Resection vs Open Resection on Pathological Outcomes in Rectal Cancer: The ALaCaRT Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015;314(13):1356-63.
56. Collinson FJ, Jayne DG, Pigazzi A, Tsang C, Barrie JM, Edlin R, Garbett C, Guillou P, Holloway I, Howard H, Marshall H, McCabe C, Pavitt S, Quirke P, Rivers CS, Brown JM. An international, multicentre, prospective, randomised, controlled, unblinded, parallel-group trial of robotic-assisted versus standard laparoscopic surgery for the curative treatment of rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27(2):233-41.
57. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv22-iv40.
58. Swedish Rectal Cancer Trial; Cedermark B, Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L, Rutqvist LE, Wilking N. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 1997;336(14):980-7.
59. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R; German Rectal Cancer Study Group. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1731-40.
60. Ansari N, Solomon MJ, Fisher RJ, Mackay J, Burmeister B, Ackland S, Heriot A, Joseph D, McLachlan SA, McClure B, Ngan SY. Acute Adverse Events and Postoperative Complications in a Randomized Trial of Preoperative Short-course Radiotherapy Versus Long-course Chemoradiotherapy for T3 Adenocarcinoma of the Rectum: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial (TROG 01.04). *Ann Surg*. 2017;265(5):882-888.
61. Hendren SK, O'Connor BI, Liu M, Asano T, Cohen Z, Swallow CJ, Macrae HM, Gryfe R, McLeod RS. Prevalence of male and female sexual dysfunction is high following surgery for rectal cancer. *Ann Surg*. 2005;242(2):212-23.
62. Jørgensen JB, Bondeven P, Iversen LH, Laurberg S, Pedersen BG. Pelvic insufficiency fractures frequently occur following preoperative chemo-radiotherapy for rectal cancer - a nationwide MRI study. *Colorectal Dis*. 2018;20(10):873-880.
63. Gerard JP, Coquard R, Fric D, Ayzac L, Romestaing P, Ardiet JM, Rocher FP, Baron MH, Trillet-Lenoir V. Curative endocavitary irradiation of small rectal cancers and preoperative radiotherapy in T2 T3 (T4) rectal cancer. A brief overview of the Lyon experience. *Eur J Surg Oncol*. 1994;20(6):644-7.
64. Du D, Su Z, Wang D, Liu W, Wei Z. Optimal Interval to Surgery After Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2018;17(1):13-24.
65. Ryan JE, Warrier SK, Lynch AC, Ramsay RG, Phillips WA, Heriot AG. Predicting pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: a systematic review. *Colorectal Dis*. 2016;18(3):234-46.

66. McQuade RM, Stojanovska V, Bornstein JC, Nurgali K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr Med Chem*. 2017;24(15):1537-1557.
67. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A; ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 5:v93-7.
68. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii1-9. Erratum in: *Ann Oncol*. 2015;26 Suppl 5:v174-7.
69. Venook A. Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2005;10(4):250-61.
70. Couwenberg AM, Burbach JPM, van Grevenstein WMU, Smits AB, Consten ECJ, Schiphorst AHW, Wijffels NAT, Heikens JT, Intven MPW, Verkooijen HM. Effect of Neoadjuvant Therapy and Rectal Surgery on Health-related Quality of Life in Patients With Rectal Cancer During the First 2 Years After Diagnosis. *Clin Colorectal Cancer*. 2018;17(3):e499-e512.
71. Ashburn JH, Kalady MF. Radiation-Induced Problems in Colorectal Surgery. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016;29(2):85-91.
72. Lenz HJ, Ou FS, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Blanke CD, Zemla T, Qu X, Wirapati P, Tejpar S, Innocenti F, Kabbarah O. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2019;37(22):1876-1885.
73. Boakye D, Rillmann B, Walter V, Jansen L, Hoffmeister M, Brenner H. Impact of comorbidity and frailty on prognosis in colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2018;64:30-39.
74. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, Souglakos J, Shi Q, Kerr R, Labianca R, Meyerhardt JA, Vernerey D, Yamanaka T, Boukovinas I, Meyers JP, Renfro LA, Niedzwiecki D, Watanabe T, Torri V, Saunders M, Sargent DJ, Andre T, Iveson T. Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1177-1188.
75. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2335-42.
76. Martins M, Mansinho A, Cruz-Duarte R, Martins SL, Costa L. Anti-EGFR Therapy to Treat Metastatic Colorectal Cancer: Not for All. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1110:113-131.
77. Lange MM, van de Velde CJ. Urinary and sexual dysfunction after rectal cancer treatment. *Nat Rev Urol*. 2011;8(1):51-7.
78. Adjuvant chemotherapy with oxaliplatin, in combination with fluorouracil plus leucovorin prolongs disease-free survival, but causes more adverse events in people with stage II or III colon cancer Abstracted from: Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Multicenter international study of oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer (MOSAIC) investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343-51. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(8):711-3.
79. Van Blarigan EL, Fuchs CS, Niedzwiecki D, Zhang S, Saltz LB, Mayer RJ, et al. Association of Survival With Adherence to the American Cancer Society Nutrition and

- Physical Activity Guidelines for Cancer Survivors After Colon Cancer Diagnosis: The CALGB 89803/Alliance Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(6):783-790. Erratum in: *JAMA Oncol.* 2019;5(4):579.
80. Golshani G, Zhang Y. Advances in immunotherapy for colorectal cancer: a review. *Therap Adv Gastroenterol.* 2020;13:1756284820917527.
 81. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget.* 2014;5(24):12472-508.
 82. Bubeník J, Baresová M, Viklický V, Jakoubková J, Sainerová H, Donner J. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer.* 1973;11(3):765-73.
 83. Hollinshead A, Elias EG, Arlen M, Buda B, Mosley M, Scherrer J. Specific active immunotherapy in patients with adenocarcinoma of the colon utilizing tumor-associated antigens (TAA). A phase I clinical trial. *Cancer.* 1985;56(3):480-9.
 84. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1.
 85. Kettleborough CA, Saldanha J, Heath VJ, Morrison CJ, Bendig MM. Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng.* 1991;4(7):773-83.
 86. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(4):325-38.
 87. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, Qian ZR, Cohen O, Nishihara R, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.* 2016;15(4):857-865. Erratum in: *Cell Rep.* 2016;17(4):1206.
 88. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, Morse MA, Van Cutsem E, McDermott R, Hill A, Sawyer MB, Hendlish A, Neyns B, Svrcek M, Moss RA, Ledezne JM, Cao ZA, Kamble S, Kopetz S, André T. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(8):773-779.
 89. Hodge JW, McLaughlin JP, Kantor JA, Schlom J. Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant non-replicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor responses. *Vaccine.* 1997;15(6-7):759-68.
 90. García-Martínez E, Smith M, Buqué A, Aranda F, de la Peña FA, Ivars A, Cánovas MS, Conesa MAV, Fucikova J, Spisek R, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Trial Watch: Immunostimulation with recombinant cytokines for cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2018;7(6):e1433982.
 91. Xu H, Xu B. Breast cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chin J Cancer Res.* 2023;35(6):565-583.
 92. Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(7):2015-2020.
 93. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007;18(3):581-92.
 94. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Jemal A. Cancer in Africa 2012. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(6):953-66.
 95. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahn AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2004;5(1):24-7.
 96. Glassman I, Le N, Asif A, Goulding A, Alcantara CA, Vu A, Chorbajian A, Mirhosseini M, Singh M, Venketaraman V. The Role of Obesity in Breast Cancer Pathogenesis. *Cells.* 2023;12(16):2061.

97. Scala M, Bosetti C, Bagnardi V, Possenti I, Specchia C, Gallus S, Lugo A. Dose-response Relationships Between Cigarette Smoking and Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Epidemiol.* 2023;33(12):640-648.
98. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, et al; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer.* 2002;87(11):1234-45.
99. Lee J, Lee J, Lee DW, Kim HR, Kang MY. Sedentary work and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *J Occup Health.* 2021;63(1):e12239.
100. Xie F, Liu L, Yang H, Liu M, Wang S, Guo J, et al. The Impact of Reproductive Factors on the Risk of Breast Cancer by ER/PR and HER2: A Multicenter Case-Control Study in Northern and Eastern China. *Oncologist.* 2022;27(1):e1-e8.
101. Press DJ, Sullivan-Halley J, Ursin G, Deapen D, McDonald JA, Strom BL, et al. Breast cancer risk and ovariectomy, hysterectomy, and tubal sterilization in the women's contraceptive and reproductive experiences study. *Am J Epidemiol.* 2011;173(1):38-47.
102. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(23):2228-2239.
103. Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(11):669-76.
104. Alberg AJ, Singh S. Epidemiology of breast cancer in older women: implications for future healthcare. *Drugs Aging.* 2001;18(10):761-72.
105. Torabi Dalivandan S, Plummer J, Gayther SA. Risks and Function of Breast Cancer Susceptibility Alleles. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):3953.
106. Stordal B. Breastfeeding reduces the risk of breast cancer: A call for action in high-income countries with low rates of breastfeeding. *Cancer Med.* 2023;12(4):4616-4625.
107. Peters TM, Moore SC, Gierach GL, Wareham NJ, Ekelund U, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Leitzmann MF. Intensity and timing of physical activity in relation to postmenopausal breast cancer risk: the prospective NIH-AARP diet and health study. *BMC Cancer.* 2009;9:349.
108. Shield KD, Soerjomataram I, Rehm J. Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(6):1166-81.
109. Takkouche B, Regueira-Méndez C, Etminan M. Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(20):1439-47.
110. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC, Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 2018;5(2):77-106.
111. Hophan SL, Odnokoz O, Liu H, Luo Y, Khan S, Gradishar W, Zhou Z, Badve S, Torres MA, Wan Y. Ductal Carcinoma In Situ of Breast: From Molecular Etiology to Therapeutic Management. *Endocrinology.* 2022;163(4):bqac027.
112. Hophan SL, Odnokoz O, Liu H, Luo Y, Khan S, Gradishar W, Zhou Z, Badve S, Torres MA, Wan Y. Ductal Carcinoma In Situ of Breast: From Molecular Etiology to Therapeutic Management. *Endocrinology.* 2022;163(4):bqac027.
113. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015;24 Suppl 2:S26-35.

114. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, Perou CM, Nielsen TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368-76.
115. Prat A, Cruz C, Hoadley KA, Díez O, Perou CM, Balmaña J. Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147(1):185-91.
116. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):21-7.
117. Pan L, Li J, Xu Q, Gao Z, Yang M, Wu X, Li X. HER2/PI3K/AKT pathway in HER2-positive breast cancer: A review. *Medicine (Baltimore)*. 2024;103(24):e38508.
118. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461-1473.
119. Fu X, Tan W, Song Q, Pei H, Li J. BRCA1 and Breast Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:813457.
120. Godet I, Gilkes DM. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther*. 2017;4(1):10.15761/ICST.1000228.
121. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1291-9.
122. Stachs A, Stubert J, Reimer T, Hartmann S. Benign Breast Disease in Women. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(33-34):565-574.
123. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2022;83(2):1-7.
124. Linder JM, Schiska AD. Progress in diagnosis of breast cancer: Advances in radiology technology. *Asia Pac J Oncol Nurs*. 2015;2(3):186-191.
125. Mitra S, Dey P. Fine-needle aspiration and core biopsy in the diagnosis of breast lesions: A comparison and review of the literature. *Cytojournal*. 2016;13:18.
126. Au FW, Ghai S, Lu FI, Moshonov H, Crystal P. Histological Grade and Immunohistochemical Biomarkers of Breast Cancer: Correlation to Ultrasound Features. *J Ultrasound Med*. 2017;36(9):1883-1894.
127. Ji JH, Ahn SG, Yoo Y, Park SY, Kim JH, Jeong JY, Park S, Lee I. Prediction of a Multi-Gene Assay (Oncotype DX and MammaPrint) Recurrence Risk Group Using Machine Learning in Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer-The BRAIN Study. *Cancers (Basel)*. 2024;16(4):774.
128. Pesapane F, Downey K, Rotili A, Cassano E, Koh DM. Imaging diagnosis of metastatic breast cancer. *Insights Imaging*. 2020;11(1):79.
129. Sessa C, Balmaña J, Bober SL, Cardoso MJ, Colombo N, Curigliano G, Domchek SM, Evans DG, Fischerova D, Harbeck N, Kuhl C, Lemley B, Levy-Lahad E, Lambertini M, Ledermann JA, Loibl S, Phillips KA, Paluch-Shimon S; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline. *Ann Oncol*. 2023;34(1):33-47.
130. Duffy S, Vulkan D, Cuckle H, Parmar D, Sheikh S, Smith R, Evans A, Blyuss O, Johns L, Ellis I, Sasieni P, Wale C, Myles J, Moss S. Annual mammographic screening to reduce breast cancer mortality in women from age 40 years: long-term follow-up of the UK Age RCT. *Health Technol Assess*. 2020;24(55):1-24.
131. Gao Y, Reig B, Heacock L, Bennett DL, Heller SL, Moy L. Magnetic Resonance Imaging in Screening of Breast Cancer. *Radiol Clin North Am*. 2021;59(1):85-98.
132. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al; ESMO Guidelines Committee. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines

- for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-1220. Erratum in: *Ann Oncol.* 2019;30(10):1674. Erratum in: *Ann Oncol.* 2021;32(2):284.
133. Hammer C, Fanning A, Crowe J. Overview of breast cancer staging and surgical treatment options. *Cleve Clin J Med.* 2008;75 Suppl 1:S10-6.
 134. Abass MO, Gismalla MDA, Alsheikh AA, Elhassan MMA. Axillary Lymph Node Dissection for Breast Cancer: Efficacy and Complication in Developing Countries. *J Glob Oncol.* 2018;4:1-8.
 135. Hara Y, Otsubo R, Shinohara S, Morita M, Kuba S, Matsumoto M, Yamanouchi K, Yano H, Eguchi S, Nagayasu T. Lymphedema After Axillary Lymph Node Dissection in Breast Cancer: Prevalence and Risk Factors-A Single-Center Retrospective Study. *Lymphat Res Biol.* 2022;20(6):600-606.
 136. Schmauss D, Machens HG, Harder Y. Breast Reconstruction after Mastectomy. *Front Surg.* 2016;2:71.
 137. Speers C, Pierce LJ. Postoperative Radiotherapy After Breast-Conserving Surgery for Early-Stage Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol.* 2016;2(8):1075-82.
 138. Mukesh MB, Duke S, Parashar D, Wishart G, Coles CE, Wilson C. The Cambridge post-mastectomy radiotherapy (C-PMRT) index: a practical tool for patient selection. *Radiother Oncol.* 2014;110(3):461-6.
 139. Gutt R, Dawson G, Cheuk AV, Fosmire H, Moghanaki D, Kelly M, Jolly S. Palliative Radiotherapy for the Management of Metastatic Cancer: Bone Metastases, Spinal Cord Compression, and Brain Metastases. *Fed Pract.* 2015;32(Suppl 4):12S-16S.
 140. Liu YP, Zheng CC, Huang YN, He ML, Xu WW, Li B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm (2020).* 2021;2(3):315-340.
 141. Cho B. Intensity-modulated radiation therapy: a review with a physics perspective. *Radiat Oncol J.* 2018;36(1):1-10. Epub 2018. Erratum in: *Radiat Oncol J.* 2018;36(2):171.
 142. Teoh M, Clark CH, Wood K, Whitaker S, Nisbet A. Volumetric modulated arc therapy: a review of current literature and clinical use in practice. *Br J Radiol.* 2011;84(1007):967-96.
 143. Busschaert SL, Kimpe E, Gevaert T, De Ridder M, Putman K. Deep Inspiration Breath Hold in Left-Sided Breast Radiotherapy: A Balance Between Side Effects and Costs. *JACC CardioOncol.* 2024;6(4):514-525.
 144. Mutter RW, Choi JI, Jimenez RB, Kirova YM, Fagundes M, Haffty BG, et al. Proton Therapy for Breast Cancer: A Consensus Statement From the Particle Therapy Cooperative Group Breast Cancer Subcommittee. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;111(2):337-359.
 145. Kyei KA, Daniels J, Pratt-Ainooson F, Anim-Sampong S, Nkansah EO, Amoabeng KA, Antwi WK. Incidence and severity of acute radiation induced toxicities among breast cancer patients treated with adjuvant radiotherapy at a major cancer treatment center in Ghana. *Transl Oncol.* 2024;47:102032.
 146. Tommasi C, Balsano R, Corianò M, Pellegrino B, Saba G, Bardanzellu F, Denaro N, Ramundo M, Toma I, Fusaro A, Martella S, Aiello MM, Scartozzi M, Musolino A, Solinas C. Long-Term Effects of Breast Cancer Therapy and Care: Calm after the Storm? *J Clin Med.* 2022;11(23):7239.
 147. Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Brønnum D, et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(11):987-98.

148. Burt LM, Ying J, Poppe MM, Suneja G, Gaffney DK. Risk of secondary malignancies after radiation therapy for breast cancer: Comprehensive results. *Breast*. 2017;35:122-129.
149. Shah C, Al-Hilli Z, Vicini F. Advances in Breast Cancer Radiotherapy: Implications for Current and Future Practice. *JCO Oncol Pract*. 2021;17(12):697-706.
150. Poortmans PMP, Takanen S, Marta GN, Meattini I, Kaidar-Person O. Winter is over: The use of Artificial Intelligence to individualise radiation therapy for breast cancer. *Breast*. 2020;49:194-200.
151. Liedtke C, Kolberg HC. Systemic Therapy of Advanced/Metastatic Breast Cancer - Current Evidence and Future Concepts. *Breast Care (Basel)*. 2016;11(4):275-281.
152. Bagnyukova TV, Serebriiskii IG, Zhou Y, Hopper-Borge EA, Golemis EA, Astsaturov I. Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents? *Cancer Biol Ther*. 2010;10(9):839-53.
153. Rubio IT, Sobrido C. Neoadjuvant approach in patients with early breast cancer: patient assessment, staging, and planning. *Breast*. 2022;62 Suppl 1(Suppl 1):S17-S24.
154. Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2020;50(3):225-229.
155. Abotaleb M, Kubatka P, Caprnda M, Varghese E, Zolakova B, Zubor P, et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:458-477.
156. Crawford J, Herndon D, Gmitter K, Weiss J. The impact of myelosuppression on quality of life of patients treated with chemotherapy. *Future Oncol*. 2024;20(21):1515-1530.
157. Ryan JL. Treatment of Chemotherapy-Induced Nausea in Cancer Patients. *Eur Oncol*. 2010;6(2):14-16.
158. da Costa R, Passos GF, Quintão NLM, Fernandes ES, Maia JRLCB, Campos MM, et al. Taxane-induced neurotoxicity: Pathophysiology and therapeutic perspectives. *Br J Pharmacol*. 2020;177(14):3127-3146.
159. Qiu Y, Jiang P, Huang Y. Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms, monitoring, and prevention. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1242596.
160. Brower V. Tracking chemotherapy's effects on secondary cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(19):1421-2.
161. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2018;186:1-24.
162. Fabian CJ. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *Int J Clin Pract*. 2007;61(12):2051-63.
163. Lu YS, Wong A, Kim HJ. Ovarian Function Suppression With Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists for the Treatment of Hormone Receptor-Positive Early Breast Cancer in Premenopausal Women. *Front Oncol*. 2021;11:700722.
164. Krauss K, Stickeler E. Endocrine Therapy in Early Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2020;15(4):337-346.
165. Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol*. 2017;8(2):120-134.
166. Strassmer-Weippl K, Goss PE. Prevention of breast cancer using SERMs and aromatase inhibitors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003;8(1):5-18.
167. Kawalec P, Łopuch S, Mikrut A. Effectiveness of targeted therapy in patients with previously untreated metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Breast Cancer*. 2015;15(2):90-100.e1.

168. Wei W, Lewis MT. Identifying and targeting tumor-initiating cells in the treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):R135-55.
169. Debien V, De Caluwé A, Wang X, Piccart-Gebhart M, Tuohy VK, Romano E, Buisseret L. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. *NPJ Breast Cancer*. 2023;9(1):7.
170. Liu K, Mao X, Li T, Xu Z, An R. Immunotherapy and immunobiomarker in breast cancer: current practice and future perspectives. *Am J Cancer Res*. 2022;12(8):3532-3547.
171. Wang Z, You P, Yang Z, Xiao H, Tang X, Pan Y, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in the treatment of unresectable locally advanced or metastatic triple negative breast cancer: a meta-analysis on their efficacy and safety. *BMC Cancer*. 2024;24(1):1339.
172. Ghahremani Dehbokri S, Alizadeh N, Isazadeh A, Baghbanzadeh A, Abbaspour-Ravasjani S, Hajiasgharzadeh K, Baradaran B. CTLA-4: As an Immunosuppressive Immune Checkpoint in Breast Cancer. *Curr Mol Med*. 2023;23(6):521-526.
173. Mercogliano MF, Bruni S, Mauro FL, Schillaci R. Emerging Targeted Therapies for HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(7):1987.
174. Frey N, Porter D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):e123-e127.
175. Li ZY, Shen QH, Mao ZW, Tan CP. Rising Interest in the Development of Metal Complexes in Cancer Immunotherapy. *Chem Asian J*. 2022;17(13):e202200270.
176. Todorov L, Kostova I. Recent Trends in the Development of Novel Metal-Based Antineoplastic Drugs. *Molecules*. 2023;28(4):1959.
177. Peña Q, Wang A, Zaremba O, Shi Y, Scheeren HW, Metselaar JM, Kiessling F, Pallares RM, Wuttke S, Lammers T. Metallodrugs in cancer nanomedicine. *Chem Soc Rev*. 2022;51(7):2544-2582.
178. Ali KA, Abd-Elzaher MM, Mahmoud K. Synthesis and Anticancer Properties of Silver(I) Complexes Containing 2,6-Bis(substituted)pyridine Derivatives. *Int J Med Chem*. 2013;2013:256836.
179. Ramos-Inza S, Plano D, Sanmartín C. Metal-based compounds containing selenium: An appealing approach towards novel therapeutic drugs with anticancer and antimicrobial effects. *Eur J Med Chem*. 2022;244:114834.
180. Rafique S, Idrees M, Nasim A, Akbar H, Athar A. Transition Metal Complexes as Potential Therapeutic Agents. *Biotechnol Mol Biol Rev*. 2010;5(2):38–45.
181. Melník M, Mikuš P. Structural Aspects of Monomeric Platinum Coordination Complexes. *Materials Sciences and Applications*. 2014;5:512–47.
182. Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat*. 2005;8(3):131-46.
183. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition Of Cell Division In Escherichia Coli By Electrolysis Products From A Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205:698-9.
184. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(6):1103-24.
185. Shu X, Xiong X, Song J, He C, Yi C. Base-Resolution Analysis of Cisplatin-DNA Adducts at the Genome Scale. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55(46):14246-14249.
186. Veclani D, Tolazzi M, Cerón-Carrasco JP, Melchior A. Intercalation Ability of Novel Monofunctional Platinum Anticancer Drugs: A Key Step in Their Biological Action. *J Chem Inf Model*. 2021;61(9):4391-4399.
187. Kumar S, Tchounwou PB. Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*. 2015;6(38):40734-46.

- 188.Oun R , Moussa YE , Wheate NJ . The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* 2018;47(19):6645-6653.
- 189.Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-21.
- 190.Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol.* 2003;21(11):2059-69.
- 191.Kelland L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues. Satraplatin and picoplatin. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007;16(7):1009-21.
- 192.Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(8):1197-218.
- 193.Abu-Surrah AS, Kettunen M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr Med Chem.* 2006;13(11):1337-57.
- 194.Ruiz J, Lorenzo J, Sanglas L, Cutillas N, Vicente C, Villa MD, Avilés FX, López G, Moreno V, Pérez J, Bautista D. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with the model nucleobase anions of thymine, uracil, and cytosine: antitumor activity and interactions with DNA of the platinum compounds. *Inorg Chem.* 2006;45(16):6347-60.
- 195.Wei X, Yang Y, Ge J, Lin X, Liu D, Wang S, Zhang J, Zhou G, Li S. Synthesis, characterization, DNA/BSA interactions and in vitro cytotoxicity study of palladium(II) complexes of hispolon derivatives. *J Inorg Biochem.* 2020;202:110857.
- 196.Barbosa HFG, Attjioui M, Ferreira APG, Moerschbacher BM, Cavalheiro ÉTG. New series of metal complexes by amphiphilic biopolymeric Schiff bases from modified chitosans: Preparation, characterization and effect of molecular weight on its biological applications. *Int J Biol Macromol.* 2020;145:417-428.
- 197.Eskandari A, Kundu A, Johnson A, Karmakar S, Ghosh S, Suntharalingam K. A trimetallic palladium complex with breast cancer stem cell potency. *Dalton Trans.* 2020;49(14):4211-4215.
- 198.Oliveira CG, Romero-Canelón I, Coverdale JPC, Maia PIS, Clarkson GJ, Deflon VM, Sadler PJ. Novel tetranuclear PdII and PtII anticancer complexes derived from pyrene thiosemicarbazones. *Dalton Trans.* 2020;49(28):9595-9604.
- 199.Erkisa M, Aydinlik S, Cevatemre B, Aztopal N, Akar RO, Celikler S, Yilmaz VT, Ari F, Ulukaya E. A promising therapeutic combination for metastatic prostate cancer: Chloroquine as autophagy inhibitor and palladium(II) barbiturate complex. *Biochimie.* 2020;175:159-172.
- 200.Franich AA, Živković MD, Milovanović J, Arsenijević D, Arsenijević A, Milovanović M, Djuran MI, Rajković S. In vitro cytotoxic activities, DNA- and BSA-binding studies of dinuclear palladium(II) complexes with different pyridine-based bridging ligands. *J Inorg Biochem.* 2020;210:111158.
- 201.Karami K, Jamshidian N, Zakariazadeh M, Momtazi-Borojeni AA, Abdollahi E, Amirghofran Z, Shahpiri A, Nasab AK. Experimental and theoretical studies of Palladium-hydrazide complexes' interaction with DNA and BSA, in vitro cytotoxicity activity and plasmid cleavage ability. *Comput Biol Chem.* 2021;91:107435.
- 202.Dannen SD, Cornelison L, Durham P, Morley JE, Shahverdi K, Du J, Zhou H, Sudlow LC, Hunter D, Wood MD, Berezin MY, Gerasimchuk N. New in vitro highly cytotoxic

- platinum and palladium cyanoximates with minimal side effects in vivo. *J Inorg Biochem.* 2020;208:111082.
203. Deng J, Li H, Yang M, Wu F. Palladium porphyrin complexes for photodynamic cancer therapy: effect of porphyrin units and metal. *Photochem Photobiol Sci.* 2020;19(7):905-912.
 204. Claudel M, Schwarte JV, Fromm KM. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. *Chemistry.* 2020;2(4):849–99.
 205. Gasser G, Metzler-Nolte N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16(1-2):84-91.
 206. Chlumsky O, Purkrtova S, Michova H, Sykorova H, Slepicka P, Fajstavr D, Ulbrich P, Viktorova J, Demnerova K. Antimicrobial Properties of Palladium and Platinum Nanoparticles: A New Tool for Combating Food-Borne Pathogens. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):7892.
 207. El-Attar MS, Elshafie HS, Sadeek SA, El-Farargy AF, El-Desoky SI, El-Shwiniy WH, Camele I. Biochemical Characterization and Antimicrobial Activity against Some Human or Phyto-Pathogens of New Diazonium Heterocyclic Metal Complexes. *Chem Biodivers.* 2022;19(2):e202100785.
 208. Zalevskaya O, Gur'eva Y, Kutchin A, Hansford KA. Antimicrobial and Antifungal Activities of Terpene-Derived Palladium Complexes. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(5):277.
 209. Silveira CHD, Vieceli V, Clerici DJ, Santos RCV, Iglesias BA. Investigation of isomeric tetra-cationic porphyrin activity with peripheral [Pd(bpy)Cl]⁺ units by antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101920.
 210. Itohiya H, Matsushima Y, Shirakawa S, Kajiyama S, Yashima A, Nagano T, Gomi K. Organic resolution function and effects of platinum nanoparticles on bacteria and organic matter. *PLoS One.* 2019;14(9):e0222634.
 211. Guerra W, de Andrade Azevedo E, de Souza Monteiro AR, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, Nascimento AM, Fontes AP, Le Moyec L, Pereira-Maia EC. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *J Inorg Biochem.* 2005;99(12):2348-54.
 212. F. Arnesano and G. Natile. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coord Chem Rev.* 2009;253(15-16):2070–2081.
 213. Bersworth FC. British Patent 723, 316. 1955.
 214. Haydock DB, Mulholland TP. Some derivatives of NN'-biscarboxymethyl- and NN'-bis-(-carboxyethyl)-ethylenediamine. *J Chem Soc Perkin 1.* 1971;13:2389-95.
 215. Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem.* 2010;5(6):881-9.
 216. Savić A, Misirlić-Denčić S, Dulović M, Mihajlović-Lalić LE, Jovanović M, Grgurić-Šipka S, Marković I, Sabo TJ. Synthesis, characterization and ROS-mediated cytotoxic action of novel (S,S)-1,3-propanediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and corresponding esters. *Bioorg Chem.* 2014;54:73-80
 217. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF. *Inorg Chem.* 1968;7(11):2386-2393
 218. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol.* 1961;3(2):208-218.

219. Reichmann ME , Rice SA , Thomas CA, Doty P. A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid. *J Am Chem Soc.* 1954;76(11):3047-3053.
220. Petrović ĐS, Jovičić Milić SS, Đukić MB, Radojević ID, Jurišević MM, Gajović NM, Petrović A, Arsenijević NN, Jovanović IP, Avdović E, Stojković DL, Jevtić VV. Synthesis, characterization, HSA binding, molecular docking, cytotoxicity study, and antimicrobial activity of new palladium(II) complexes with propylenediamine derivatives of phenylalanine. *J Inorg Biochem.* 2023;246:112283.
221. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Berlin: Springer; 2006.
222. Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry.* 1973;12(21):4161-70.
223. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, Poljarevic J, Sabo T, Vojvodic D, Radosavljevic GD, Arsenijevic N. The organic ester O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget.* 2018;9(46):28195-28212.
224. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
225. Bostan M, Petrică-Matei GG, Ion G, Radu N, Mihăilă M, Hainăroșie R, Brașoveanu LI, Roman V, Constantin C, Neagu MT. Cisplatin effect on head and neck squamous cell carcinoma cells is modulated by ERK1/2 protein kinases. *Exp Ther Med.* 2019;18(6):5041-5051.
226. Popović A, Nikolić M, Mijajlović M, Ratković Z, Jevtić V, Trifunović SR, et al. DNA binding and antitumor activities of zinc(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transition Met Chem.* 2019;44:219-228.
227. Konovalov B, Franich AA, Jovanović M, Jurišević M, Gajović N, Jovanović M, et al. Synthesis, DNA-/bovine serum albumin-binding affinity, and cytotoxicity of dinuclear platinum(II) complexes with 1,6-naphthyridine-bridging ligand. *Appl Organomet Chem.* 2021;35(3):1:15.
228. Andrews JM; BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):60-76.
229. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007;42(4):321-4.
230. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat IM. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):1015-9.
231. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids: Crystal structure of the bis(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂]. *Polyhedron.* 2012;31(1):69-76.
232. Savić A, Misirlić-Denčić S, Dulović M, Mihajlović-Lalić LE, Jovanović M, Grgurić-Šipka S, Marković I, Sabo TJ. Synthesis, characterization and ROS-mediated cytotoxic action of novel (S,S)-1,3-propanediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and corresponding esters. *Bioorg Chem.* 2014;54:73-80.
233. Savić A, Filipović L, Arandelović S, Dojčinović B, Radulović S, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum(II) iodido complexes. *Eur J Med Chem.* 2014;82:372-84.

- 234.Liu H, Shi X, Xu M, Li Z, Huang L, Bai D, Zeng Z. Transition metal complexes of 2, 6-di ((phenazonyl-4-imino) methyl)-4-methylphenol: structure and biological evaluation. *Eur J Med Chem.* 2011;46(5):1638-47.
- 235.Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012;33(3):209-90.
236. Sułkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *J Mol Struct.* 2002;614(1-3):227-232.
- 237.Moriggi L, Yaseen MA, Helm L, Caravan P. Serum albumin targeted, pH-dependent magnetic resonance relaxation agents. *Chemistry.* 2012;18(12):3675-86.
- 238.Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7(4):481-9.
- 239.Zhang QL, Liu JG, Chao H, Xue GQ, Ji LN. DNA-binding and photocleavage studies of cobalt(III) polypyridyl complexes: *J Inorg Biochem.* 2001;83(1):49-55.
240. Skyrianou KC, Raptopoulou CP , Psycharis V , Kessissoglou DP, Psomas G. *Polyhedron.* 2009;28(15):3265 —3271.
- 241.Tarushi A, Psomas G, Raptopoulou CP, Kessissoglou DP. Zinc complexes of the antibacterial drug oxolinic acid: structure and DNA-binding properties. *J Inorg Biochem.* 2009;103(6):898-905.
- 242.Fioravanzo LP, Pôrto JB, Martins FM, Siqueira JD, Iglesias BA, Rodrigues BM, Chaves OA, Back DF. A Vanadium(V) complexes derived from pyridoxal/salicylaldehyde. Interaction with CT-DNA/HSA, and molecular docking assessments. *J Inorg Biochem.* 2023;239:112070.
- 243.Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, Ribeiro-Dos-Santos Â. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):4133.
- 244.Kumar R, Saneja A, Panda AK. An Annexin V-FITC-Propidium Iodide-Based Method for Detecting Apoptosis in a Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line. *Methods Mol Biol.* 2021;2279:213-223.
- 245.Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205-218.
- 246.Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol.* 2022;12:985363.
- 247.Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta.* 2019;491:39-45.
- 248.Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1960.
- 249.Chi Y, Huang S, Liu M, Guo L, Shen X, Wu J. Cyclin D3 predicts disease-free survival in breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2015;15:89.
250. Stone NN, Stock RG, Unger P. Effects of neoadjuvant hormonal therapy on prostate biopsy results after (125)I and (103)Pd seed implantation. *Mol Urol* 2000;4(3):163–8.
- 251.Potters L, Cao Y, Calugaru E, Torre T, Fearn P, Wang XH. A comprehensive review of CT-based dosimetry parameters and biochemical control in patients treated with permanent prostate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;50(3):605-14.
- 252.Ruiz J, Lorenzo J, Sanglas L, Cutillas N, Vicente C, Villa MD, Avilés FX, López G, Moreno V, Pérez J, Bautista D. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with the model nucleobase anions of thymine, uracil, and cytosine: antitumor activity and interactions with DNA of the platinum compounds. *Inorg Chem.* 2006;45(16):6347-60.

253. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999;99(9):2467-98.
254. D. Anu, P. Naveen, Nigam P. Rath, M.V. Kaveri. Palladium (II) complexes containing substituted thiosemicarbazones. Synthesis, spectral characterization, X-ray crystallography, biomolecular interactions and in vitro cytotoxicity. *Journal of Molecular Structure.* 2020;1206:127703.
255. Khan BT, Bhatt J, Najmuddin K, Shamsuddin S, Annapoorna K. Synthesis, antimicrobial, and antitumor activity of a series of palladium(II) mixed ligand complexes. *J Inorg Biochem.* 1991;44(1):55-63.
256. Mansuri-Torshizi H, Srivastava TS, Parekh HK, Chitnis MP. Synthesis, spectroscopic, cytotoxic, and DNA binding studies of binuclear 2,2'-bipyridine-platinum(II) and -palladium(II) complexes of meso- α,α' -diaminoadipic and meso- α,α' -diaminosuberic acids. *J Inorg Biochem.* 1992;45(2):135-48.
257. Stojković DLj, Jevtić VV, Radić GP, Todorović DV, Petrović M, Zarić M, Nikolić I, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid. *J Inorg Biochem.* 2015;143:111-6.
258. Plitzko B, Kaweesa EN, Loesgen S. The natural product mensacarcin induces mitochondrial toxicity and apoptosis in melanoma cells. *J Biol Chem.* 2017;292(51):21102-21116.
259. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205-218.
260. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(1):33-43.
261. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
262. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
263. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ.* 2012;19(5):735-42.
264. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res.* 2020;9:F1000 Faculty Rev-148.
265. Xu Y, Shen J, Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy.* 2020;16(1):3-17.
266. Zam W, Ahmed I, Yousef H. The Warburg Effect on Cancer Cells Survival: The Role of Sugar Starvation in Cancer Therapy. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol.* 2021;16(1):30-38.
267. Qian Y, Chen X. Senescence regulation by the p53 protein family. *Methods Mol Biol.* 2013;965:37-61.
268. Zeng Y, Ma J, Xu L, Wu D. Natural Product Gossypol and its Derivatives in Precision Cancer Medicine. *Curr Med Chem.* 2019;26(10):1849-1873
269. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008714.
270. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):65-80.
271. Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ.* 2000;7(12):1182-91.

272. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol.* 2012;2012:524308.
273. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a008722.
274. Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1071-80.
275. Yang QF, Sakurai T, Yoshimura G, Shan L, Suzuma T, Tamaki T, Umemura T, Kokawa Y, Nakamura Y, Nakamura M, Tang W, Utsunomiya H, Mori I, Kakudo K. Expression of Bcl-2 but not Bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;61(3):211-6.
276. Del Bufalo D, Biroccio A, Trisciuglio D, Bruno T, Floridi A, Aquino A, Zupi G. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used. *Eur J Cancer.* 2002;38(18):2455-62.
277. Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995;55(17):3902-7.
278. Huang Y, Ray S, Reed JC, Ibrado AM, Tang C, Nawabi A, Bhalla K. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;42(1):73-81.
279. Gao G, Dou QP. G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58(5):1001-10.
280. Knowlton K, Mancini M, Creason S, Morales C, Hockenbery D, Anderson BO. Bcl-2 slows in vitro breast cancer growth despite its antiapoptotic effect. *J Surg Res.* 1998;76(1):22-6.
281. Phesse TJ, Myant KB, Cole AM, Ridgway RA, Pearson H, Muncan V, van den Brink GR, Vousden KH, Sears R, Vassilev LT, Clarke AR, Sansom OJ. Endogenous c-Myc is essential for p53-induced apoptosis in response to DNA damage in vivo. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):956-66.
282. Ha JH, Shin JS, Yoon MK, Lee MS, He F, Bae KH, Yoon HS, Lee CK, Park SG, Muto Y, Chi SW. Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *J Biol Chem.* 2013;288(10):7387-98.
283. He K, Zheng X, Zhang L, Yu J. Hsp90 inhibitors promote p53-dependent apoptosis through PUMA and Bax. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(11):2559-68.
284. Takahashi M, Kakudo Y, Takahashi S, Sakamoto Y, Kato S, Ishioka C. Overexpression of DRAM enhances p53-dependent apoptosis. *Cancer Med.* 2013;2(1):1-10.
285. Olivos DJ, Mayo LD. Emerging Non-Canonical Functions and Regulation by p53: p53 and Stemness. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):1982.
286. Querino ALA, Enes KB, Chaves OA, Dittz D, Couri MRC, Diniz R, Silva H. Modified pyrazole platinum(II) complex can circumvent albumin and glutathione: Synthesis, structure and cytotoxic activity. *Bioorg Chem.* 2020;100:103936.
287. Zhou M, Boulous JC, Omer EA, Rudbari HA, Schirmeister T, Micale N, Efferth T. Two palladium (II) complexes derived from halogen-substituted Schiff bases and 2-picolyamine induce parthanatos-type cell death in sensitive and multi-drug resistant CCRF-CEM leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2023;956:175980.
288. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205-218

- 289.Meergans T, Hildebrandt AK, Horak D, Haenisch C, Wendel A. The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells. *Biochem J.* 2000;349(Pt 1):135-40.
- 290.Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):231-41
291. Metz GE, Galindo I, Abeyá MM, Echeverría MG, Alonso C. Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus Res.* 2016;213:219-223.
- 292.Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009;23(6):1625-37.
- 293.Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):42-50.
- 294.Lossi L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochem J.* 2022;479(3):357-384.
295. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013;87(7):1157-80.
- 296.Panganiban RA, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):15931-58.
- 297.Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005;54(7):1024-33.
- 298.Espino J, Fernández-Delgado E, Estirado S, de la Cruz-Martinez F, Villa-Carballar S, Viñuelas-Zahinos E, Luna-Giles F, Pariente JA. Synthesis and structure of a new thiazoline-based palladium(II) complex that promotes cytotoxicity and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):16745.
- 299.Hsieh CJ, Hsu YL, Huang YF, Tsai EM. Molecular Mechanisms of Anticancer Effects of Phytoestrogens in Breast Cancer. *Curr Protein Pept Sci.* 2018;19(3):323-332.
- 300.Eskra JN, Kuiper JW, Walden PD, Bosland MC, Özten N. Interactive effects of 9-cis-retinoic acid and androgen on proliferation, differentiation, and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Eur J Cancer Prev.* 2017;26(1):71-77.
- 301.Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM, Klimstra DS. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(12):1761-70.
- 302.Yim EK, Park JS. Biomarkers in cervical cancer. *Biomark Insights.* 2007;1:215-25.
- 303.Ciocoloni G, Soteriou C, Websdale A, Wallis L, Zulyniak MA, Thorne JL. Phytosterols and phytostanols and the hallmarks of cancer in model organisms: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(5):1145-1165.
- 304.Yang F, Wu W, Wang X, Zhang Q, Bao Y, Zhou Z, Jin C, Ji Y, Windsor JA, Lou W, Fu D. Grading Solid Pseudopapillary Tumors of the Pancreas: the Fudan Prognostic Index. *Ann Surg Oncol.* 2021;28(1):550-559.
- 305.Franich AA, Živković MD, Ćoćić D, Petrović B, Milovanović M, Arsenijević A, Milovanović J, Arsenijević D, Stojanović B, Djuran MI, Rajković S. New dinuclear palladium(II) complexes with benzodiazines as bridging ligands: interactions with CT-DNA and BSA, and cytotoxic activity. *J Biol Inorg Chem.* 2019;24(7):1009-1022.
- 306.Ćoćić D, Jovanović S, Radisavljević S, Korzekwa J, Scheurer A, Puchta R, Baskić D, Todorović D, Popović S, Matić S, Petrović B. New monofunctional platinum(II) and palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interaction, and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem.* 2018;189:91-102.
- 307.Wang Y, Li W, Wang Z, Ren H, Li Y, Zhang Y, Yang P, Pan S. Genistein upregulates cyclin D1 and CDK4 expression and promotes the proliferation of ovarian cancer OVCAR-5 cells. *Clin Chim Acta.* 2021;512:100-105.

308. Chi Y, Huang S, Liu M, Guo L, Shen X, Wu J. Cyclin D3 predicts disease-free survival in breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2015;15:89.
309. Alqahtani T, Kumarasamy VM, Huczyński A, Sun D. Salinomycin and its derivatives as potent RET transcriptional inhibitors for the treatment of medullary thyroid carcinoma. *Int J Oncol.* 2020;56(1):348-358.
310. Jovičić Milić SS, Jevtić VV, Radisavljević SR, Petrović BV, Radojević ID, Raković IR, Petrović ĐS, Stojković DL, Jurišević M, Gajović N, Petrović A, Arsenijević N, Jovanović I, Klisurić OR, Vuković NL, Vukić M, Kačániová M. Synthesis, characterization, DNA interactions and biological activity of new palladium(II) complexes with some derivatives of 2-aminothiazoles. *J Inorg Biochem.* 2022;233:111857.
311. Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohal JS. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *Biomed Res Int.* 2022;2022:5419874.
312. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(6):371-84.
313. Frei A, Verderosa AD, Elliott AG, Zuegg J, Blaskovich MAT. Metals to combat antimicrobial resistance. *Nat Rev Chem.* 2023;7(3):202-224.
314. Alqahtani T, Kumarasamy VM, Huczyński A, Sun D. Salinomycin and its derivatives as potent RET transcriptional inhibitors for the treatment of medullary thyroid carcinoma. *Int J Oncol.* 2020;56(1):348-358.
315. Đ. S. Petrović, S. S. J. Milić, M. B. Đukić, I. D. Radojević, R. M. Jelić, M. M. Jurišević, et al. Synthesis, characterization, HSA/DNA binding, cytotoxicity study, and antimicrobial activity of new palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-propylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl)butanoic acid. *Inorg Chim Acta.* 2021;528:120601.
316. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. P. Radić, M. B. Đukić, R. M. Jelić, M. M. Zarić, et al. Stereospecific ligands and their complexes, XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(II) and Pt(II) complexes with R²-S,S-EDDTyr. *New J Chem.* 2018;42:3924–3935.
317. G. P. Radić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović. Stereospecific ligands and their complexes. X. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-methyl) butanoic acid. *Inorg Chim Acta.* 2012;391:44–49.
318. S. S. Jovičić Milić, V. V. Jevtić, D. Lj. Stojković, Đ. S. Petrović, E. H. Avdović, Z. S. Marković, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(3,3'-1H-indol-3yl)-propionic acid. *Inorg Chim Acta.* 2020;510:119743.
319. G. P. Vasić, V. V. Glođović, I. D. Radojević, O. D. Stefanović, Lj. R. Čomić, V. M. Đinović and S. R. Trifunović. Stereospecific ligands and their complexes. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid. *Inorg Chim Acta.* 2010;363:3606–3610.
320. Dejana P. Dimitrijević, Verica V. Glođović, Gordana P. Radić, Santiago García-Granda, Laura Menéndez-Taboada, Marija Milovanović, et al. Stereospecific ligands and their complexes. Part XV. Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) complexes with some esters of ethylenediamine-N,N'-di-S,S-(2,2''-dibenzyl)acetic acid. Crystal structure of O,O''-dipropyl-ethylenediamine-N,N''-di-S,S-(2,2''-dibenzyl)acetate dihydrochloride. *Inorganica Chimica Acta.* 2013;402:83-89.

ПРИЛОЗИ

СКРАЋЕНИЦЕ

NSAID	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
K-Ras	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
MUTYH	<i>mutY DNA glycosylase homolog</i>
G-протеин	<i>Guanine nucleotide-binding protein</i>
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
CIN	<i>Chromosomal instability pathway</i>
MSI	<i>Microsatellite instability pathway</i>
CIMP	<i>CpG island methylation pathway</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MLH1	<i>MutL Homolog 1</i>
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS Homolog 6</i>
PMS2	<i>Postmeiotic Segregation 2</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
AFAP	<i>Attenuated Familial Adenomatous Polyposis</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colon cancer</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CT	<i>Computed tomography</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
TNM	<i>Tumour, Node, Metastasis</i>
FOBT	<i>Fecal occult blood test</i>
FIT	<i>Fecal immunochemical test</i>
NCCN®	<i>National Comprehensive Cancer Network®</i>
ACOSOG	<i>American College of Surgeons Oncology Group</i>

ALaCaRT	<i>Australasian Laparoscopic Cancer of the Rectum Trial</i>
CRM	<i>Circumferential Resection Margin</i>
EBRT	<i>External beam radiation therapy</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
EUS	<i>Endoscopic Ultrasound</i>
CRC	<i>Colorectal Cancer</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
ACT	<i>Adoptive cell transfer</i>
TSA	<i>Tumor-specific antigens</i>
TAA	<i>Tumor-associated antigens</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
MUC1	<i>The transmembrane glycoprotein mucin 1</i>
IFN-α	<i>Interferon-alpha</i>
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
BRCA1	<i>BReast CAncer gene 1</i>
BRCA2	<i>BReast CAncer gene 2</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor-2</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
MKI67	<i>Marker of Proliferation Ki-67</i>
AURKA	<i>Aurora Kinase A</i>
ERBB2	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
KRT5	<i>Keratin 5</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>

BRCT	<i>BRCA1 C-Terminal</i>
CHEK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
BRIP1	<i>BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase 1</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
PALB2	<i>Partner And Localizer of BRCA2</i>
FNA	<i>Fine Needle Aspiration</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
PARP	<i>Poly-ADP ribose polymerase</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulators</i>
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitors</i>
CAR-T	<i>Chimeric Antigen Receptor T cell</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
IR	<i>Infrared</i>
CT26	<i>Colon Tumor 26</i>
4T1	<i>4 Tumor 1</i>
HCT116	<i>Human Colorectal Tumor 116</i>
MDA-MB-468	<i>MDA-M.D. Anderson Cancer Center, MB- Metastatic Breast 468</i>
mMSCs	<i>mouse Mesenchymal Stem Cells</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
CT-DNA	<i>Calf Thymus DNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagles Medium</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MMC	<i>Minimal Microbicidal Concentration</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis</i>

Smac DIABLO *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases; Direct IAP-Binding Protein with Low pI*

Omi *Outer Mitochondrial Membrane-associated protease*

c-Myc *Cellular Myelocytomatosis oncogene*

Mdm2 *Mouse Double Minute 2 homolog*

TNF *Tumor Necrosis Factor*

Fas *First apoptosis signal receptor*

CD40 *Cluster of Differentiation 40*

TRAIL *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

DISC *Death Inducing Signalling Complex*

CAD *Caspase-Activated Dnase*

ICAD *Inhibitor of Caspase-Activated Dnase*

Apaf-1 *Apoptosis Protease-Activating Factor 1*

Биографија

Кемал Ћоровић, рођен 23. фебруара 1984. године у Новом Пазару, Република Србија, истакао се одличним успехом у основној и средњој школи у Тутину, где је добитник и бројних награда за успех током школовања. Наставио је образовање на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, где је уписан 2002. године. Дипломирао је 2008. године са просечном оценом 9,30 и стекао назив доктора медицине. Од 2008. године запослен је у Дому здравља Тутин. Исте 2008. године уписује докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје: клиничка и експериментална интерна медицина, а потом мења изборно подручје у клиничка и експериментална хирургија и положио је усмени докторски испит у марту 2011 године. Након тога је започео специјализацију из области опште хирургије 2013. године на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу и завршио у јануару 2019. године. Од 2020 године је именован на функцију в.д. директора Дома здравља Тутин коју и даље успешно обавља. Ожењен је и отац двоје деце. Аутор је и коаутор више радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом. Познаје рад на рачунарима (Word, Excel, PowerPoint, SPSS) и говори енглески језик.

Библиографија

1. **Corovic K.**, Stojanovic B., Petrovic A., Stanisavljevic I., Maric V., Zdravkovic N. and Jovanovic M. (2023). Modulatory Role of Galectin-1 in Ulcerative Colitis with Comorbid Metabolic Syndrome. Experimental and Applied Biomedical Research (EABR), 2023;0:0. doi:10.2478/eabr-2023-0006 **M51**
2. **Kemal Ćorović**, Danijela Lj. Stojković, Đorđe S. Petrović, Sandra S. Jovičić Milić, Maja B. Đukić, Ivana D. Radojević, Ivana Raković, Milena Jurišević, Nevena Gajović, Marina Jovanović, Jovana Marinković, Ivan Jovanović, Bojan Stojanović. Newly synthesized palladium(II) complexes with dialkyl esters of (*S,S*) propylenediamine-*N,N'*-di- (2,2'-di-(4-hydroxy-benzil))acetic acid: in vitro investigation of biological activities and HSA/DNA binding. Dalton Trans 2024;53(18):7922-7938. doi:10.1039/d4dt00659c. **M21**
3. Vucelj S., Corovic I., Jovanovic M., Petrovic A., Stanisavljevic I., Stojanovic B., **Corovic K.**, Andrejevic I., Zdravkovic N., Dimitrijevic Stojanovic M., Balovic, G., Stojanovic B. Associations between metabolic syndrome, ulcerative colitis, and fecal sST2 and CXCL8 levels: Unveiling new inflammatory pathways. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2023;24(4):1-10. doi:10.2478/sjecr-2023-0013 **M51**



Cite this: DOI: 10.1039/d4dt00659c

Newly synthesized palladium(II) complexes with dialkyl esters of (S,S)-propylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzil))acetic acid: *in vitro* investigation of biological activities and HSA/DNA binding†

Kemal Čorović,^{a,f} Danijela Lj. Stojković,^{b,g,h} Đorđe S. Petrović,^c Sandra S. Jovićić Milić,^d Maja B. Đukić,^e Ivana D. Radojević,^e Ivana Raković,^e Milena Jurišević,^{f,g} Nevena Gajović,^g Marina Jovanović,^{g,h} Jovana Marinković,^g Ivan Jovanović,^g and Bojan Stojanović^{g,i}

The four new ligands, dialkyl esters of (S,S)-propylenediamine-*N,N'*-di-(2,2'-di-(4-hydroxy-benzil))acetic acid (R₂-S,S-pddtyr-2HCl) (R = ethyl (L1), propyl (L2), butyl (L3), and pentyl (L4)) and corresponding palladium(II) complexes have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy. *In vitro* cytotoxicity was evaluated using the MTT assay on four tumor cell lines, including mouse mammary (4T1) and colon (CT26), and human mammary (MDA-MD-468) and colon (HCT116), as well as non-tumor mouse mesenchymal stem cells. Using fluorescence spectroscopy were investigated the interactions of new palladium(II) complexes [PdCl₂(R₂-S,S-pddtyr)] (R = ethyl (C1), propyl (C2), butyl (C3), and pentyl (C4)) with calf thymus human serum albumin (HSA) and DNA (CT-DNA). The high values of the binding constants, K_b, and the Stern–Volmer quenching constant, K_{SV}, show the good binding of all complexes for HSA and CT-DNA. The mentioned ligands and complexes were also tested on *in vitro* antimicrobial activity against 11 microorganisms. Testing was performed by the microdilution method, where the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum microbicidal concentration (MBC) were determined.

Received 4th March 2024,
Accepted 3rd April 2024
DOI: 10.1039/d4dt00659c
rsc.li/dalton

Introduction

With discovery of cisplatin,¹ chemotherapy with metal-based drugs represents one of the most widely used strategies in clinical practice for cancer therapy.

Therefore, the discovery of new potential anticancer compounds has become one of the most important goals in medicinal chemistry, and for these reasons, medicinal chemistry has developed rapidly, especially in the field of drug design and development.² The main reason is to obtain new potential drugs or to modify the parent compounds with different structural modifications to achieve the desired profile of biological activity and less limitations due to toxicity and resistance. Non-platinum complexes may exhibit anticancer activity and toxic side effects that differ significantly from those of platinum-based drugs, which are expected to have different chemical behavior, hydrolysis rates, and mechanisms of action. Based on the structural analogy between platinum(II) and palladium(II) complexes, there is great interest in the study of palladium(II) complexes as potential anticancer drugs.³ The appli-

^aCommunity Health Center Tutin, Department of Emergency Medicine, Bogofubas Čukčića 12, 36320 Tutin, Republic of Serbia

^bUniversity of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia. E-mail: danijela.stojkovic@kg.ac.rs

^cUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radvoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^dUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radvoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^eUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Infectious Diseases, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^fUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^gUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

^hUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Otorinolaryngology, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

ⁱUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Surgery, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d4dt00659c>



Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II)
са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))
сирћетне киселине

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 10.12.2024. године,

Зенка Ђорђевић
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:

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II)
са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил))
сирћетне киселине

истоветне.

У Крагујевцу, 10.12.2024. године,

Дечан Ђоровић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Кемал Ћоровић

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса паладијума(II) са диалкил естрима (S,S)-пропилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди-(4-хидрокси-бензил)) сирћетне киселине

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

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 10.12.2024. 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/>