



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Миладин М. Бошковић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И  
ПОТЕНЦИЈАЛНИ АНТИТУМОРСКИ  
ЕФЕКТИ 1,5-НАФТИРИДИНСКИХ  
ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА  
ПАЛАДИЈУМА(II)**

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Miladin M. Bošković

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I  
POTENCIJALNI ANTITUMORSKI  
EFEKTI 1,5-NAFTIRIDINSKIH  
DINUKLEARNIH KOMPLEKSA  
PALADIJUMA(II)**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Miladin M. Bošković

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION  
AND POTENTIAL ANTITUMOR  
EFFECTS OF 1,5-NAPHTYRIDINE  
DINUCLEAR COMPLEXES OF  
PALADIUM(II)**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Миладин Бошковић
Датум и место рођења: 06.02.1975. године, Сјеница, Србија
Садашње запослење: Универзитетски клинички центар Крагујевац, Клиника за општу хирургију; Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Катедра за хирургију
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Синтеза, карактеризација и потенцијални антитуморски ефекти 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II)
Број страница: 64
Број слика: 16
Број библиографских података: 85
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина - Клиничка и експериментална хирургија
<b>Коментор:</b> др сци. мед. Александар Арсенијевић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Коментор:</b> др сци. мед. Марија Живковић, ванредни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-03-564/14 од 14.07.2021. године

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Miladin Bošković
Datum i mesto rođenja: 06.02.1975. godine, Sjenica, Srbija
Sadašnje zaposlenje: Univerzitetski klinički centar Kragujevac, Klinika za opštu hirurgiju; Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za hirurgiju
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: Sinteza, karakterizacija i potencijalni antitumorski efekti 1,5-naftiridinskih dinuklearnih kompleksa paladijuma(II)
Broj stranica: 64
Broj slika: 16
Broj bibliografskih podataka: 85
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina - Klinička i eksperimentalna hirurgija
<b>Komentor:</b> dr sci. med. Aleksandar Arsenijević, vanredni profesor, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
<b>Komentor:</b> dr sci. med. Marija Živković, vanredni profesor, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Broj odluke i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije: IV-03-564/14 od 14.07.2021. godine

<b>Author</b>
Name and surname: Miladin Bošković
Date and place of birth: 06.02.1975. Sjenica, Serbia
Current employment: University Clinical Center Kragujevac, Clinic for General Surgery; University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Surgery
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Synthesis, characterization and potential antitumor effects of 1,5-naphthyridine dinuclear complexes of palladium(II)
No. of pages: 64
No. of images: 16
No. of references: 85
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDC): Clinical and Experimental Surgery
<b>Comentor:</b> dr sci. med. Aleksandar Arsenijević, associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Comentor:</b> dr sci. med. Marija Živković, associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-564/14 from 14.07.2021.

## АПСТРАКТ

**Увод:** Ранија испитивања бројних нафтиридинских деривата указују на постојање њиховог антитуморског, антимикробног и антиинфламаторног дејства.

**Циљ:** Циљ истраживања је био да се испита потенцијално антитуморско деловање новосинтетисаних 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II).

**Материјал и метод:** Студија је реализована као експериментално *in vitro* истраживање на неколико малигних ћелијских линија. Динуклеарни комплекси добијени су по модификованом поступку за синтезу. Карактеризација комплекса је извршена применом елементалне микроанализе, ултраљубичасте и инфрацрвене спектрофотометрије, као и помоћу нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије. Вијабилност малигних ћелија третираних новосинтетисаним комплексима паладијума(II) испитивана је МТТ колориметријским тестом. Анализа апоптозе укључила је експресију проапоптотских и антиапоптотских протеина, који су испитивани проточном цитометријом.

**Резултати:** Пет динуклеарних комплекса Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> су синтетисани и спектроскопски окарактерисани. Цитотоксична активност је тестирана на неколико ћелијских линија карцинома миша и на хуманим ћелијским линијама.

**Закључак:** Сви тестирани Pd(II) комплекси су смањили одрживост ћелијских линија тумора у односу на дату дозу. Највиши цитотоксични капацитет показао је комплекс Pd<sub>5</sub>. Могући механизам цитотоксичне активности Pd<sub>5</sub> комплекса је повећавање апоптозе, кроз смањивање дејства Bcl-2 и повећавање дејства каспазе тип 3.

**Кључне речи:** синтеза, карактеризација, антитуморски ефекат, 1,5-нафтиридински динуклеарни комплекс паладијума(II).

## ABSTRACT

**Introduction:** Earlier studies of numerous naphthyridine derivatives indicates the presence of their antitumor, antimicrobial and anti-inflammatory effects.

**Objective:** The objective of this study was to investigate the potential antitumor effect of newly synthesized 1,5-naphthyridine dinuclear palladium(II) complexes.

**Material and method:** The study was conducted as an experimental *in vitro* study on several malignant cell lines. Dinuclear complexes were obtained by a modified procedure. Characterization of the complexes was carried out using elemental microanalysis, ultraviolet and infrared spectrophotometry and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. The viability of malignant cells treated with newly synthesized palladium(II) complexes was investigated by MTT colorimetric test. Analysis of apoptotic death involved the expression of proapoptotic and antiapoptotic proteins measured by flow cytometry.

**Results:** Five dinuclear Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> complexes were synthesized and spectroscopically characterized. Cytotoxic effect of complexes was tested on several mouse and human cancer cell lines.

**Conclusion:** All tested Pd(II) complexes reduced the viability of tumor cell lines in correlation with the given dose. The highest cytotoxic activity was shown by the Pd<sub>5</sub> complex. A possible mechanism of the cytotoxic effect of Pd<sub>5</sub> complex may be increasing the apoptotic process, through decreased activity of Bcl-2 and increased activity of caspase-3.

**Key words:** synthesis, characterization, antitumor effect, 1,5-naphthyridine dinuclear complexes of palladium.



# САДРЖАЈ

<b>1.</b>	<b>УВОД.....</b>	<b>1</b>
1.1	Колоректални карцином .....	4
1.2	Карцином плућа .....	9
1.3	Карцином дојке .....	11
1.4	Апоптоза .....	15
1.5	Антитуморски лекови на бази јона метала.....	20
1.5.1	Паладијум .....	21
1.5.1.1	<i>Оксидационо стање +2 .....</i>	<i>21</i>
1.5.2	Комплексна једињења паладијума(II) .....	21
<b>2.</b>	<b>ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ .....</b>	<b>27</b>
3.1	Синтеза [ $\{Pd(L)Cl\}_2(\mu-1,5\text{-phe})](NO_3)_2$ комплекса .....	28
3.1.2.	Карактеризација комплекса паладијума(II) .....	28
3.2	Ћелијске линије .....	28
3.3	Варијабле .....	29
3.3.1	МТТ тест .....	29
3.3.2	Анализа апоптозе .....	30
3.3.2.1	<i>Анализа проточном цитометријом ћелија третираних испитиваним комплексима паладијума(II) обојених обојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом (PI) .....</i>	<i>30</i>
3.3.2.2	<i>Анализа експресије проапоптотских и антиапоптотских протеина проточном цитометријом .....</i>	<i>30</i>
3.4	Снага студије и величина узорка .....	31
3.5	Статистичка обрада података .....	31
<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>32</b>
4.1	Синтеза и структурна карактеризација динуклеарних паладијум(II) комплекса Pd <sub>1</sub> -Pd <sub>5</sub> .....	33
4.1.1.	Елементална микроанализа .....	33

4.1.2	NMR карактеризација	34
4.1.3	IR и UV-Vis карактеризација	35
4.2	Цитотоксична активност комплекса Pd <sub>1</sub> -Pd <sub>5</sub>	38
<b>5.</b>	<b>ДИСКУСИЈА</b>	<b>43</b>
5.1	Синтеза и карактеризација Pd <sub>1</sub> -Pd <sub>5</sub> комплекса	44
5.1.1	NMR спектроскопска карактеризација Pd <sub>1</sub> -Pd <sub>5</sub> комплекса	45
5.1.2	IR и UV-Vis карактеризација Pd <sub>1</sub> -Pd <sub>5</sub> комплекса	47
<b>6.</b>	<b>ЗАКЉУЧЦИ</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>55</b>
	Биографија аутора	60

# **1. УВОД**

Упркос вишедеценијским напорима учињеним на пољу развоја антитуморских агенаса, сматра се да карциноми и даље имају водеће место у светском морбидитету и морталитету (1). Светска здравствена организација (СЗО) је указала на податак да је приближно 10 милиона смртних исхода у 2020. години било директно и/или индиректно узроковано карциномима - табела 1 (1).

*Табела 1. Морталитет од карцинома у 2020. години на глобалном нивоу  
(адаптирано на основу реф.1)*

Облик карцинома	Број смртних исхода
<b>Карцином плућа</b>	1.800.000
<b>Колоректални карцином</b>	935.000
<b>Карцином јетре</b>	830.000
<b>Карцином абдоминалне регије</b>	769.000
<b>Карцином дојке</b>	685.000

Највећи број смртних исхода је у 2020. години био од карцинома плућа, колоректалног карцинома, карцинома јетре, карцинома абдоминалне регије, те карцинома дојке (1). Такође, сваке године чак 400.000 деце оболи од карцинома (1). Сматра се да инциденција карцинома драматично расте са старошћу, јер се са годинама повећава број фактора ризика, те смањује могућност адаптивних промена ћелија, када је реч о њиховим патолошким оштећењима (1). Неки од најзначајнијих фактора ризика препознати од стране СЗО су пушење цигарета, конзумација алкохолних пића, лош начин исхране, физичка неактивност и загађеност ваздуха (1). Када је реч о Републици Србији, епидемиолошка ситуација малигних тумора је донедавно праћена помоћу стопа морталитета, без обзира што Национални регистар за рак постоји од почетка седамдесетих година прошлог века (2). Међутим, битно је нагласити да је реорганизација постојећег Националног регистра за рак у Републици Србији, а која је извршена 1996. године, допринела да стопе обољевања до данас буду скоро удвостручене (2). У складу са јавно доступним подацима из Националног регистра за рак Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“, 2017. године је од рака оболело преко 41.000 особа, односно скоро 22.000 мушкараца и знатно мање жена - око 19.500 особа (2). Стопа инциденције, када је карцином у питању, је код мушкараца износила чак 324,8 на 100.000 становника, док је код жена износила 274,7 на 100.000 становника (2). Штавише, највише стопе оболевања су код мушкараца биле у округу Северног Баната и округу Северне Бачке, а слича ситуација је била и код жена. Када је реч о стопи морталитета, она је код мушкараца износила 165,3, док је код жена била знатно мања, 108,8- табела 2 (2).

**Табела 2.** Стопе морталитета од малигнух неоплазми на територији Републике Србије за период 2010. до 2019. године (адаптирано на основу реф.2)

Година	Укупно	Мушкарци	Жене
<b>2010</b>	289,9	341,8	240,8
<b>2011</b>	289,4	342,3	239,3
<b>2012</b>	295,4	346,1	247,4
<b>2013</b>	294,4	346,9	244,6
<b>2014</b>	299,0	348,9	251,6
<b>2015</b>	301,3	358,2	247,2
<b>2016</b>	305,0	356,4	256,1
<b>2017</b>	305,9	353,4	260,7
<b>2018</b>	309,4	357,9	263,4
<b>2019</b>	307,3	358,6	258,4

Највећа стопа морталитета код мушкараца је била због карцинома плућа и простате (табела 3), док је код жена она била најизраженија код карцинома дојке, плућа и колоректалног карцинома - табела 4 (2).

**Табела 3.** Број случајева умрлих мушкараца од малигнух неоплазми према водећим локализацијама у Републици Србији - 2017. година (адаптирано на основу реф.2)

Примарна локализација (МКБ-10)	Укупно
<b>Плућа и бронх (C34)</b>	3.692
<b>Колон и ректум (C18-C20)</b>	1.592
<b>Простата (C61)</b>	1.006
<b>Желудац (C16)</b>	591
<b>Панкреас (C25)</b>	619
<b>Мокраћна бешика (C67)</b>	536
<b>Јетра (C22)</b>	423
<b>Мозак (C71)</b>	346
<b>Гркљан (C32)</b>	326
<b>Леукемија (C91-C95)</b>	414
<b>Малигне неоплазме са другом локализацијом</b>	2.542
<b>Све локализације (C00-C97)</b>	12.087

**Табела 4.** Број случајева умрлих жена од малигних неоплазми према водећим локализацијама у Републици Србији - 2017. година (адаптирано на основу реф.2)

Примарна локализација (МКБ-10)	Укупно
<b>Дојка (C50)</b>	1.766
<b>Плућа и бронх (C34)</b>	1.577
<b>Колон и ректум (C18-C20)</b>	1.049
<b>Панкреас (C25)</b>	537
<b>Јајници (C56)</b>	434
<b>Грлић материце (C53)</b>	487
<b>Желудац (C16)</b>	336
<b>Јетра (C22)</b>	327
<b>Материца (C54)</b>	262
<b>Мозак (C71)</b>	287
<b>Друге локализације</b>	2.326
<b>Све локализације (C00-C97)</b>	9.388

## 1.1 Колоректални карцином

У 2020. години, сходно проценама СЗО, од укупно 19.292.789 новооткривених случајева карцинома, скоро 10% њих је било колоректалних карцинома (1.931.590 новооткривених случајева), док је од укупно 9.958.133 смртних исхода због карцинома чак 9,4% смртних случајева било због карцинома са овом локализацијом (935.173 смртна случаја) (3). Наведени подаци колоректални карцином сврставају на трећем месту, према фреквенцији јављања, код особа мушког пола (на првом месту је карцином плућа, а на другом месту карцином простате), односно на другом месту код жена (после карцинома дојке) (3). Анализирајући према регионима, највећа годишња инциденција колоректалног карцинома у 2020. години је процењена у Азији (чак 1.009.400 новооткривених случајева колоректалног карцинома) и у Европи (519.820 новооткривених случајева колоректалног карцинома), док је најмања годишња инциденција била у Јужној Америци (134.943 новооткривених случајева колоректалног карцинома) и у Африци (66.198 новооткривених случајева колоректалног карцинома) (3). Такође, број преминулих од колоректалног карцинома и петогодишња преваленција (број оболелих особа од колоректалног карцинома са преживљавањем у трајању од пет година од периода постављања дијагнозе) су биле највеће у Азији (од колоректалног карцинома је преминуло укупно 506.449 особа, са петогодишњом преваленцијом од укупно 2.662.900 особа) и у Европи (укупно 244.824 особа је преминуло од колоректалног карцинома, са петогодишњом преваленцијом од укупно 1.536.168 особа) (3).

Према последњим доступним подацима на националном нивоу за Републику Србију, у 2019. години је колоректални карцином дијагностикован код 4.674 мушкараца, односно код 1.770 жена, што води ка стандардизованој стопи инциденције од 41,2 мушкараца на

100.000 становника, односно ка стандардизованој стопи инциденције од 22,6 жена на 100.000 становника (2). У истој години је од колоректалног карцинома преминуло 1.579 мушкарца (стандардизована стопа морталитета 20,2 на 100.000 становника), односно 1.012 жена, са стандардизованом стопом морталитета од 10,2 (2).

Колоректални карциноми најчешће годинама остаје асимптоматски. Када се појаве, симптоми колоректалног карцинома су најчешће подмукли и обично трају месецима или, чак, годинама, пре постављања дефинитивне дијагнозе. Код пацијената могу бити присутни замарање, слабост и анемија као последица недостатка гвожђа, уколико се колоректални карцином локализује у пределу цекума и десног дела колоне. С друге стране, ако се карцином локализује на левој страни колоне, код пацијента се може јавити окулно крварење, промена у динамици пражњења црева или осећај нелагодности, најчешће у виду грчева локализованих у доњем левом квадранту стомака. Сви колоректални карциноми се шире у околна ткива директним путем, а метастазе дају лимфогеним и хематогеним путем. Према редоследу учесталости метастатских депозита, колоректални карцином најчешће даје метастазе у регионалним лимфним чворовима, јетри, плућима и костима (4).

Иако етиологија колоректалног карцинома до данас није у потпуности разјашњена, познати су бројни фактори који се повезују са повећаним (тзв. фактори ризика), али и са смањеним ризиком за обољевање од овог облика малигнитета (тзв. протективни фактори) (5-7). Ризико фактори за настанак карцинома колоректалне регијесе, генерално, могу поделити на факторе ризика који се могу модификовати и фактореризика који нису подложни модификацији (5). Од модификујућих фактора ризика за настанак колоректалног карцинома, посебно се истичу:

- физичка неактивност;
- гојазност (висок индекс телесне масе);
- исхрана (исхрана у којој доминира црвено месо, учестало конзумирање месних прерађевина и термички обрађене хране, као и унос нитрата путем хране); и
- конзумирање алкохолних пића и пушење (5).

Када је реч о немодификујућим факторима ризика за настанак колоректалног карцинома, од значаја је истаћи:

- старосно доба (особе изнад 50 година старости имају значајнију вероватноћу да оболе од колоректалног карцинома од особа које се налазе у старосној групи од 20 до 49 година);
- пол (инциденција колоректалног карцинома је за око 40% већа код мушкараца, него код жена); и
- наследне факторе (око 20% особа са дијагностикованим колоректалним карциномом има позитивну породичну анамнезу, а код особа чији су рођаци у првој линији сродства имали колоректални карцином постоји и до три пута већи ризик да, током живота, оболе од колоректалног карцинома) (6,7).

У етиопатогенези колоректалног карцинома су значајна и различита преканцерозна стања, попут:

- неопластичног аденома;
- улцерозног колитиса;
- *Chron*-ове болести;
- дивертикулозе; и
- радијационог колитиса (5-7).

Када се говори о заштитним факторима, међу назначајније протективне факторе за настанак колоректалног карцинома спадају:

- исхрана богата дијететским влакнима, воћем и поврћем;
- суплементација са антиканцерогеним дејством (калцијум, витамин Д, фолна киселина итд.);
- примена пробиотских препарата;
- физичка активност; и
- контрацептивна средства, ацетил-салицилна киселина, зелени чај итд (6,7).

Када је реч о канцерогенези колоректалног карцинома, данас се сматра да постоје две различите патогенетске путање у развоју овог облика карцинома, а то су APC (енг. *Adematous Polyposis Coli*, APC)/ $\beta$ -катенинска путања и путања микросателитске нестабилности (путања за репарацију погрешно упарене ДНК), при чему у оба случаја долази до постепеног нагомилавања вишеструких мутација, с тим да се гени који мутирају и механизми по којима се мутације одвијају значајно разликују (8-10).

1. APC/ $\beta$ -катенинска путања (тзв. „аденом-карцином секвенца“) се јавља код 80% спорадичних колоректалних карцинома и представља путању хромозомске нестабилности која се карактерише мутацијама на нивоу протоонкогена и тумор супресорских гена, а које се постепено нагомилавају (слика 1). Најпре, долази до губитка APC тумор супресорског гена, што је иницијални догађај у секвенци настајања аденома. Услед последичног нефункцисања APC протеина, долази не само до нагомилавања  $\beta$ -катенина, већ се и накупљени  $\beta$ -катенин премешта у једро ћелије и условљава активацију транскрипције MYC (енг. *Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism*, MYC) и циклин D<sub>1</sub> гена, који даље покрећу ћелијску пролиферацију. Такође, долази и до мутације KRAS гена (енг. *Kirsten Rat Sarcoma*, KRAS). У физиолошким условима, овај ген доприноси кодирању молекула за сигналну трансдукцију која осцилира између активног стања (ген је везан за гуанин-трифосфат) и инактивног стања (ген је повезан са гуанин-дифосфатом). Мутација овог гена доприноси да он остаје у активном стању, последично и у преношењу митотских сигнала и спречавању апоптотског процеса. Данас се сматра да се мутација KRAS гена дешава код око 10% аденома који су пречника мањег од 10mm, код скоро 50% аденома који су већи од 10mm и код апроксимативно 50% карцинома колоректалне регије. Битно је напоменути да се поред наведеног и губитак тумор супресорског гена 18q21 налази у основи између 60 и 70% колоректалних карцинома. Наиме, на наведеној локацији хромозома су мапирана три гена која имају значајну улогу у кодирању сигналне путање за TGF- $\beta$  (енг. *Transforming Growth Factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ), значајне за инхибирање ћелијског циклуса у физиолошким условима, а то су DCC (енг. *Deleted in Colon Carcinoma*, DCC), SMAD<sub>2</sub> (енг. *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2*, SMAD<sub>2</sub>) и SMAD<sub>4</sub> (енг. *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4*, SMAD<sub>4</sub>) (8). Губитак наведених гена мапираних на хромозомској локацији 18q21 последично доводи до неконтролисаног ћелијског раста. Ништа мање значајан није ни губитак p53 тумор супресорског гена који се дешава нешто касније у току процеса канцерогенезе, јер га скоро нема у аденомима, или су такви губици у аденомима изузетно ретки. Осим поменутих промена, током развоја колоректалног карцинома, путем APC/ $\beta$ -катенинске путање, такође се јављају и метилациони поремећаји на нивоу тумор супресорских гена (8-10).
2. Друга патогенетска путања у настанку колоректалног карцинома је путања микросателитске нестабилности, односно путања за репарацију погрешно упарене ДНК, која се налази у основи 10 до 15% дијагностикованих

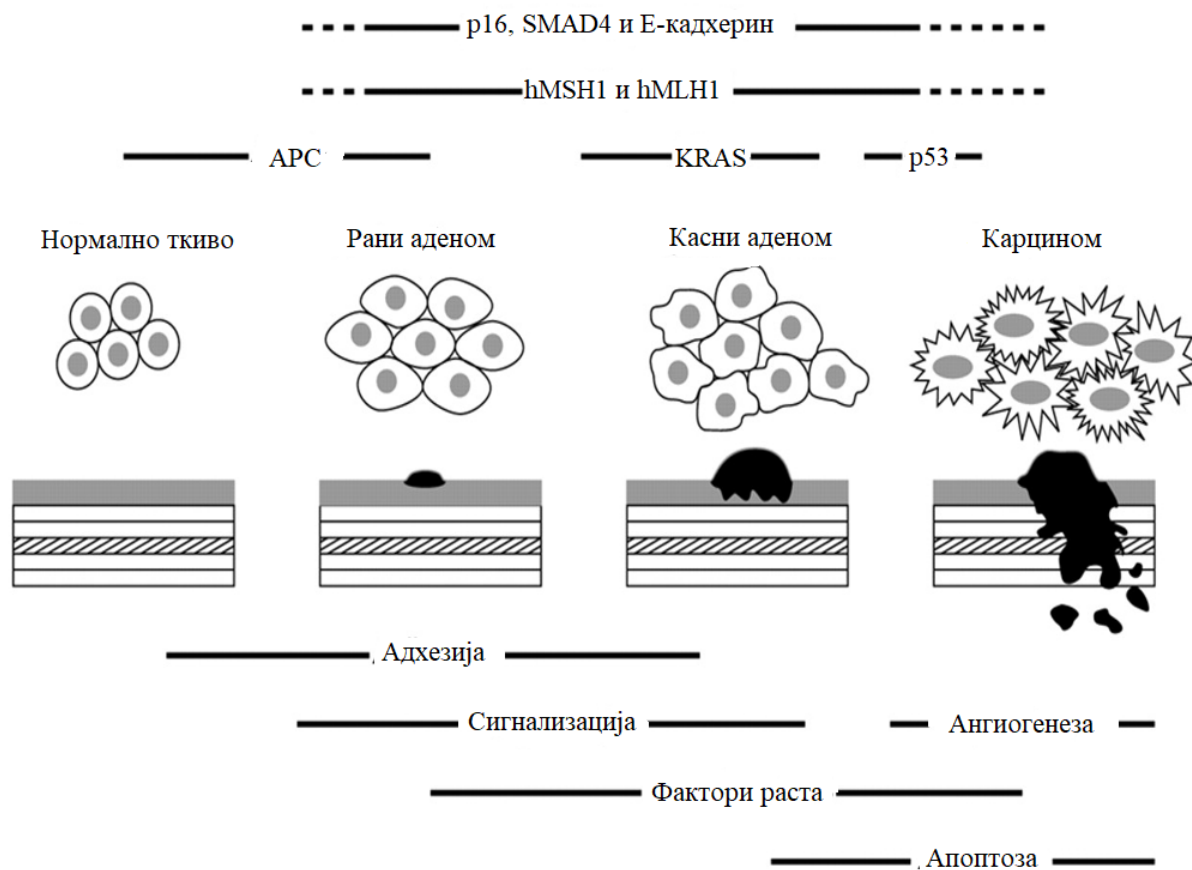


колоректалних карцинома. До настанка карцинома може доћи без претходно присутне лезије или карцином може да настане на тлу сесилног зупчастог аденома. Наиме, гени који су задужени за репарацију погрешно упарене ДНК су MSH<sub>2</sub>, MSH<sub>6</sub>, MLH<sub>1</sub>, PMS<sub>1</sub> и PMS<sub>2</sub>. Услед наследних мутација на неком од претходно поменутих гена (најчешће је реч о мутацији MSH<sub>2</sub> гену и MSH<sub>6</sub> гену), настаје херeditарни неполипозни колоректални карцином. Ово је последица хипермутабилног стања у коме су, током процеса репликације, нестабилни кратки понављани сегменти ДНК (тзв. „микросателити“), због чега се у тим понављаним сегментима јављају бројни поремећаји. С тим у вези, нестабилност микросателита представља поремећену основу за репарацију погрешно упарене ДНК. Међутим, иако још увек није препозната секвенца аденом-карцином за колоректалне карциноме који настају због микросателитске нестабилности, уочено је да код сесилних зупчастих аденома локализованих у десном колону постоји микросателитска нестабилност и да ти аденоми могу представљати преканцерозне лезије. Потпуно развијени колоректални карциноми, који настају због микросателитске нестабилности, имају посебне морфолошке карактеристике, као што су муциозна хистологија, проксимална локализација унутар дебелог црева и изражена лимфоцитна инфилтрација. Уопштено посматрано, ови колоректални карциноми свакако имају бољу прогнозу, него колоректални карциноми истог стадијума (градуса), који су последица APC/β-катенинске путање (аденом-карцином секвенце) (8-10).

На основу локализације колоректалног карцинома, у 25% случајева се он налази у цекуму или асцедентном колону, а сличан проценат случајева се локализује и у ректуму, те дисталном сегменту сигмоидног колона. Додатних 25% се налази у нискоходном делу дебелог црева и проксималном сегменту сигмоидног колона (10). Колоректални карцином је најчешће солитарна лезија и често је његово порекло маскирано аденомом, али ако је реч о мултиплим кациномима - они се често налазе на врло различитим местима дуж дебелог црева (10). Иако сви колоректални карциноми почињу као *in situ* лезије, они временом еволуирају у различите макроскопске типове карцинома. С тим у вези, тумори локализовани у проксималним сегментима дебелог црева углавном расту у виду полипоидних егзофитних маса, које имају тенденцију ширења дуж једног од зидова цекума или усходног дела дебелог црева. Колоректални карциноми који се откривају у дисталном колону расту најчешће у виду прстенастих лезија које окружују циркумфренцију црева и сужавају га, изазивајући појаву стенозе црева и сужавање њиховог лумена (10). Ивице тог прстена су најчешће издигнуте, а оба наведена облика тумора директно пенетрирају кроз зид црева и временом, а најчешће након неколико година, могу се појавити на површини серозе, у облику тврдих туморских маса (10). Међутим, без обзира на макроскопски изглед, сви колоректални карциноми су микроскопски доста слични (10).

Хистолошки типови колоректалног карцинома су бројни и врло разнолики. У око 90% случајева дијагностикованог колоректалног карцинома је хистопатолошки реч о аденокарциному, који показује различите степене диферентованости (градус I, II и III), с тим да углавном доминира средње и добро диферентовани тумор (10). Аденокарцином колоректалне регије има више различитих подтипова, и то крибриформни комедо тип, медуларни облик, микропапиларни аденокарцином, муциозни облик аденокарцинома, зупчасти облик аденокарцинома и *signed ring cell* аденокарцином колоректума (10). Када је реч о муциозном облику аденокарцинома, доминантна је муциозна компонента, а сам тумор се најчешће локализује интрацелуларно код добро- и средње диферентованих

форми, док се код слабо диферентованих облика локализује у екстраћелијском простору, односно у интерстицијалном простору - између појединачних туморских ћелија (10). *Signet ring cell* аденокарцином је, с друге стране, најређа хистопатолошка форма аденокарцинома колоректалне регије који карактерише преко 50% туморских ћелија које личе на печатни прстен - уочавају се вакуоле у цитоплазми, испуњене муцинозном компонентом, због чега је једро потиснуто ка периферији (10).



**Слика 1.** Аденом-карцином секвенца (адаптирано на основу реф. 8)

За одређивање степена малигнитета и стадијума болести, најчешће се, као параметри, у обзир узимају дубина инвазије колоректалног карцинома, захваћеност регионалних лимфних чворова, инвазија колоректалног карцинома у вене и постојање удаљених метастатских депозита (10).

Када је реч о TNM класификацији (где „Т“ означава величину тумора, „N“ захваћеност и број захваћених регионалних лимфних чворова, док „M“ означава присуство удаљених метастаза), петогодишња стопа преживљавања износи:

- 97% код T1;
- 90% код T2;
- 78% код T3;
- 63% код T4;

- 66% код T0-T4; N1; M0;
- 37% код T0-T4; N2; M0;
- нема расположивих података за облик колоректалног карцинома T0-T4; N3; M0; и
- 4% код M1 (10,11).

Поред класичне TNM класификације, за одређивање стадијума колоректалног карцинома, а тиме и прогнозе, најчешће се примењује *Dukes*-ова класификација, која колоректалне карцином категорише у три групе (10,11):

- у *Dukes* А групу спадају колоректални карциноми који инфилтришу слузокожу дебелог црева и субмукозу до мишићног слоја, али без присутних метастатских депозита у регионалним лимфним чворовима (сматра се да су пацијенти након ресекције тумора излечени);
- у *Dukes* Б групу се убрајају колоректални карциноми који инфилтришу зид црева у потпуности, а неретко се простиру и до периколичног масног ткива, без метастатских депозита на нивоу регионалних лимфних чворова (петогодишње преживљавање износи око 70%); и
- *Dukes* Ц групу, у коју спадају колоректални карциноми са метастатским депозитима у регионалним лимфним чворовима и/или удаљеним органима (петогодишње преживљавање особа са овим облицима колоректалног карцинома је 30%, уколико су присутне регионалне лимфне метастазе, односно 15%, уколико су присутни метастатски депозити у удаљеним органима).

## 1.2 Карцином плућа

Карцином плућа представља један од водећих узрока морбидитета и морталитета на планетарном нивоу, већ неколико деценија уназад. Ово малигно обољење плућа је и даље преобладајуће заступљено код мушкараца, са највећом стопом учесталости у централним и источним деловима европског континента (53,5 новооболелих на 100.000 становника) и источном делу Азије (50,4 новооболелих на 100.000 становника) (12). Најниже стопе обољевања од карцинома плућа забележене су у средњој и западној Африци (2,0, односно 1,7 новооболелих на 100.000 становника) (12). У популацији жена карцином плућа је четврти по учесталости, после карцинома дојке, колоне и грлића материце. Код жена стопа учесталости је углавном нижа, а географска заступљеност мало другачија, првенствено због различите историјске изложености пушењу дувана, који се и данас сматра главним фактором ризика за настанак овог облика малигнитета (12).

Највише стопе учесталости карцинома плућа за жене су уочене у Северној Америци (33,8 новооболеле на 100.000 становника) и северној Европи (23,7 новооболеле на 100.000 становника) са релативно високом стопом учесталости у источној Азији (19,2 оболеле на 100.000 становника) и најнижом стопом учесталости у западној Африци и Блиском Истоку (1,1 и 0,8 новооболеле на 100.000 становника) (12). Учесталост карцинома плућа у Европи се драматично променила од седамдесетих година прошлог века (12). Узрастно стандардизована стопа за мушкарце у Данској, Финској, Немачкој, Италији, Холандији, Швајцарској и Великој Британији се повећавала до раних 1980-их, а затим је почела да опада. У већини земаља јужне и источне Европе учесталост карцинома плућа се повећавала до касних 1980-их или чак до касних 1990-их (12).

Повећање стопе учесталости међу женама је било највише драматично у Данској, Великој Британији и Исланду, где се стопа учесталости у периоду последње деценије прошлог века увећала на око 30 на 100.000 становника (12). Према епидемиолошким подацима Међународне агенције за истраживање карцинома и највиша стопа учесталости у Европи 2012. године је за мушкарце била у Мађарској (око 76 на 100.000), Македонији (око 71 на 100.000) и Србији (око 70 на 100.000) (12). Највиша стопа учесталости за жене у Европи 2012. године је била у Данској (око 37 на 100.000), Мађарској (око 33 на 100.000) и Холандији (око 31 на 100.000) (12). И у светским оквирима Мађарска има највећу стопу учесталости за мушкарце у 2012. години, док је за жене то Данска (12). Када је реч о Републици Србији, од рака бронхија и плућа годишње оболи 5.200 и умре око 4.600 особа (13). Штавише, малигни тумори бронхија и плућа су водећа малигна локализација морбидитета (21,3%), али и морталитета (31,3%) у особа мушког пола, док су трећи по реду (после карцинома дојке и колоректума) узрок морбидитета (8,1%) и други по реду (после карцинома дојке) узрок морталитета (12,1%) у особа женског пола (13). Уз присутне варијације у вредностима стандардизованих стопа инциденције, у временском периоду прве деценије овог века у Републици Србији је забележен пораст морбидитета од карцинома плућа за чак 27,4% (од 42,4 на чак 50,4), а овај пораст је био више него дупло већи код особа женског пола (13). С друге стране, стандардизоване стопе морталитета у истом временском периоду су порасле за 27,6% (од 39,9 на 100.000 становника до 50,9 на 100.000 становника), са изразитим порастом код особа женског пола (13). Наведени подаци указују да је Република Србија у 2008. години била у групи земаља Европе са високим вредностима стопа морбидитета и морталитета од карцинома плућа (13).

У актуелној литератури, описују се две основне хипотезе о патогенези карцинома плућа; прва хипотеза описује теоријску основу да тумори са различитом фенотипском деференцијацијом потичу од матичне стем-ћелије са плурипотентним карактеристикама, док се друга хипотеза заснива на ставу да тумори са различитом фенотипском диференцијом могу потицати од ћелија различитих типова. Јединствен став по питању прихватања једне од наведених хипотеза још увек не постоји (14). Такође, претходна истраживања указала су да ћелије плућног карцинома могу бити морфолошких и ултраструктурних карактеристика које одговарају тотипотентним базалним ћелијама плућа, што им омогућава да током ћелијске поделеистовремено дају више потенцијалних праваца, у смислу диференцијације, и то у правцу: 1) сквамозних ћелија; 2) жлезданих ћелија; и 3) неуроендокриних ћелија (14). На основу наведеног може се делимично објаснити хетерогеност међу ћелијама истог карцинома плућа једне индивидуе (15).

Основна хистопатолошка класификација карцинома плућа је усклађена са интернационалним стандардима и препоручена од стране СЗО, те подразумева четири базична патохистолошка облика плућног карцинома, који групно имају учешће око 90% када је реч о свим малигним неоплазмама са локализацијом у плућима, и то: а) планоцелуларни карцином плућа или сквамозелуларни карцином плућа; б) аденокарцином плућа; в) макроцелуларни или крупноћелијски карцином плућа; г) и микроцелуларни или ситноћелијски карцином плућа - слика 2(14). Најчешћи типови, када се говори о примарним карциномима плућа, су свакако карциноид плућа, аденосквамозни карцином плућа, карцином плувачних жлезда и премалигне лезије плућа - слика 2 (14). Наведени основни хистопатолошки облици карцинома са локализацијом у плућима могу се додатно класификовати одређене подоблике или подгрупације, а базирано на начину раста тумора и степену инвазије, као што је детаљно приказано на слици 2 (14). Битно је нагласити да је класификација тумора плућа на

основу патохистолошких критеријума претрпела значајне измене у последњих неколико година, те да је ревидирање класификације у даљеу току, имајући у виду изражену хетерогеност тумора са овом локализацијом (14).

<b>I - СКВАМОЦЕЛУЛАРНИ КАРЦИНОМ</b>
Ситноћелијски, светлоћелијски, папиларни и базалоидни карцином
<b>II - СИТНОЋЕЛИЈСКИ КАРЦИНОМ</b>
Комбинован са крупноћелијским карциномом, најчешће са слабодиферентиваним сквамоцелуларним карциномом
<b>III - АДЕНОКАРЦИНОМ</b>
Мешовит, ацинарни, папиларни, бронхоалвеоларни (муцинозни и немучинозни тип), мешовити и солидни карцином
<b>IV - АДЕНОСКВАМОЗНИ КАРЦИНОМ</b>
Неуроендокрини, базалоидни, комбиновани са другим крупноћелијским карциномима, лимфоцителном сличан, светлоћелијски тип и карцином са рабдоидним фенотипом
<b>V - КАРЦИНОИДНИ ТУМОР</b>
Типични и атипични облик
<b>VI - КАРЦИНОМ ПЉУВАЧНИХ ЖЛЕЗДА</b>
Мукоепидермоидни, аденоид-цистични и епителијално-миоепителијални карцином
<b>VII - ПРЕМАЛИГНЕ ЛЕЗИЈЕ ПЛУЋА</b>
Дисплазија епитела и интраепителијални карцином, атипична аденоматозна хиперплазија и дифузна идиопатска плућна неуроендокрина хиперплазија

*Слика 2. Хистопатолошка класификација карцинома плућа, СЗО (адаптирано на основу реф.14)*

### 1.3 Карцином дојке

Карцином дојке данас има приоритетно место у јавноздравственим активностима широм света, јер спада у један од пет најчешћих карцинома на светском нивоу. Иако је значајно подигнута свест јавности о карцином дојке, те постигнут поприличан напредак у имџингу, широм света је и даље висока стопа морталитета од овог облика малигног тумора. Штавише, карцином дојке се данас сматра једним од водећих узрока смртности особа женског пола у постменструационом периоду, са укупним учешћем од чак 23% смртних исхода у свету (16). Према проценама СЗО, у 2020. години је скоро 2,3 милиона

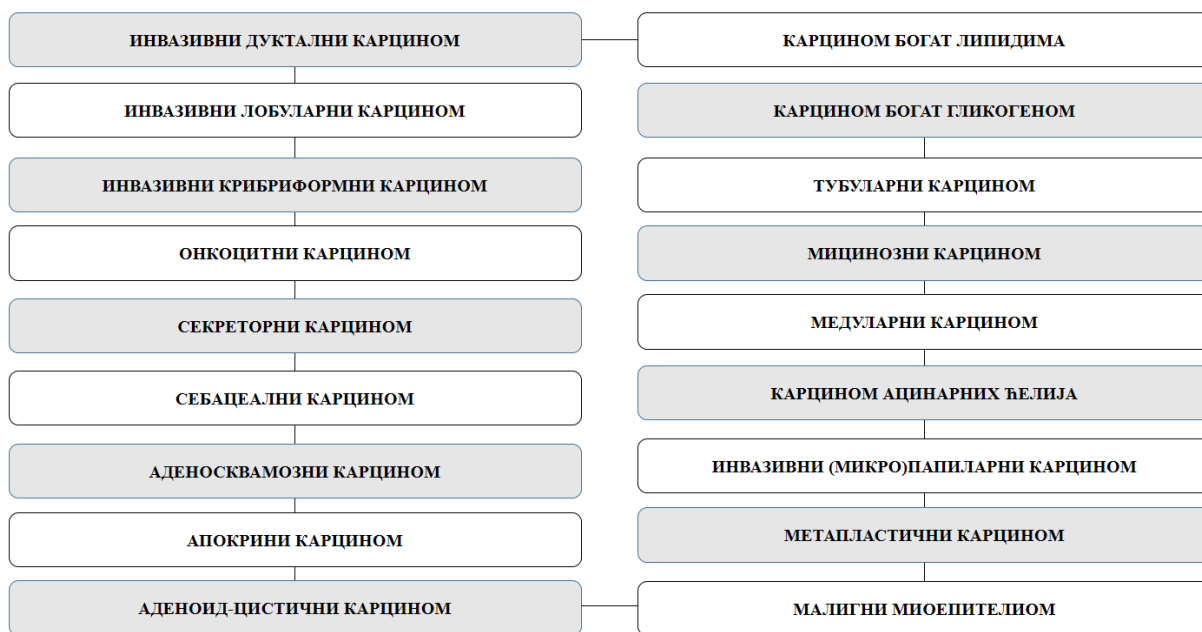
жена широм света имало постављену дијагнозу карцинома дојке, док је 685.000 жена преминуло од овог карцинома (17). До 2020. године је било више од 7,8 милиона жена којима је дијагностикован карцином дојке у последњих пет година, што несумњиво потврђује да је реч о једном од најраспрострањенијих малигних неоплазми широм света (17). Такође, према подацима СЗО, карцином дојке се јавља код жена након периода пубертета, а његова учесталост расте са годинама, односно са старашћу (17). Када је реч о Републици Србији, на основу последњих доступних података на националном нивоу из 2019. године, регистровано је укупно 4.636 новооткривених случајева карцинома дојке код жена (17). Ово води ка податку да је у 2019. години, у Републици Србији, стандардизована стопа инциденције од карцинома дојке код жена на 100.000 становника износила чак 72,3 (17). Такође, у истој години је 1.665 жена преминуло због карцинома дојке, што води ка податку да је стопа морталитета од овог карцинома код жена на 100.000 становника износила 19,3 (17). Када је реч о превентивним прегледима жена за рано откривање карцинома дојке, на основу резултата националног истраживања здравља становништва наше земље из 2019. године, преко 1/3 жена (34,6%) је изјавило да је бар једном у току живота обавило мамографски преглед (18). Од укупног броја жена које су обавиле мамографски преглед, 50,3 % њих је изјавило да је на мамографски преглед отишло по савету лекара, 34,9% самоиницијативно, док је 14,7% њих на мамографски преглед отишло по позиву лекара у оквиру организованих скрининга карцинома дојке (18). Битно је напоменути да је у циљаној популацији за рано откривање карцинома дојке 30,1% женских особа старости између 50 и 69 година урадило превентивни мамографски преглед у периоду од две године које су претходиле споменутом истраживању, док је 42,5% њих тај преглед обавило у периоду од три године које су претходиле наведеном истраживању (18). Ово је значајан податак, јер показује напредак у превентивним активностима у односу на националну студију о испитивању здравља становника Србије која се спроведено 6 година раније (2013. године), према чијим резултатима је 22,7% жена превентивни мамографски преглед обавило у периоду од две године пре спровођења истраживања, а 30,6 % њих у периоду од три године (18).

Са етиопатогенетског аспекта, до сада је дефинисан велики број фактора ризика за настанак карцинома дојке, које су приказани у табели 5 (10). Свакако, посебно је интересантна генетска предиспозиција, јер се апроксимативно 10% карцинома дојке повезује са одређеним мутацијама наследног карактера. Скоро половина особа женског пола са карциномом дојке херeditарног типа има мутације на гену BRCA-1 (енг. *Breast cancer associated gene-1*, BRCA-1) који се налази на хромозому 17q21, док једна трећина њих има мутације на гену BRCA-2 (енг. *Breastcancer associated gene-2*, BRCA-2) који се локализује на хромозому 13q12. Иако је реч о врло комплексним генима, код којих се не може утврдити значајна хомологија, као ни њихова повезаност са генима који су, до сада, добро истражени и проучени (19). Но, без обзира што је њихова улога у канцерогезени и даље предмет научних истраживања, данас се сматра да они имају битну улогу у репараторним процесима ДНК молекула. Они представљају тумор супресорске гене, јер контролишу и снижавају ћелијску пролиферацију, а њихова инактивација доводи до неопластичне трансформације. Поред наведених gena, од значаја је споменути и ген HER-2 (енг. *Human Epidermoid Growth Factor Receptor 2*, HER-2). Његова амплификација је утврђена у чак 30% случајева инвазивних карцинома дојке, а прекомерна експресија овог протоонкогена је повезана са неповољном прогнозом ове малигне болести (19).

Табела 5. Фактори ризика за карцином дојке (адаптирано на основу реф.10)

<b>Географске варијације</b>	Ризик од обољевања је повећан у Северној Америци и северном делу Европе, а смањен у Азији и Африци
<b>Старосно доба</b>	Ризик од карцинома дојке расте са годинама, али након менопаузе усходна линија прелази у плато
<b>Генетика</b>	Сматра се да код 10% карцинома дојке постоји корелација са одређеним мутацијама гена
<b>Породична анамнеза</b>	Генетски детерминисане болести код којих је повећан ризик за настанак карцинома дојке, као што су <i>Li-Fraumeni</i> синдром (мутација гена p53 на нивоу герминативних ћелија) и <i>Cowden</i> болест (мутација гена PTEN на нивоу герминативних ћелија)
<b>Генетика</b>	Мутације гена BRCA-1, BRCA-2 и HER-2
<b>Хормонски дисбаланси</b>	Вишак ендогеног естрогена, односно поремећена хормонска равнотежа има значајну улогу у настанку карцинома дојке
<b>Бенигне болести дојке</b>	Пролиферативна болест без атипичје, пролиферативна болест дојке са атипичном хиперплазијом и лобуларни <i>in situ</i> карцином
<b>Непотпуно доказани фактори ризика</b>	Егзогени естрогени, орална контрацептивна средства, гојазност, исхрана богата липидима, употреба психоактивних супстанци (алкохола и цигарета)

Када је реч о класификацији карцинома дојке, СЗО је извршила класификацију према степену инвазивности, на основу које се сви карциноми дојке деле на инвазивне (карциноме дојке који су пробали базалну мембрану) и неинвазивне или *in situ* облике (карциноми дојке који нису пробали базалну мембрану) (20). С тим у вези, усвојена је класификација инвазивних карцинома дојке - слика 3.



Слика 3. Класификација инвазивних карцинома дојке (адаптирано на основу реф.20) A

У највећем броју случајева, реч је о инвазивном дукталном карциному, који се још назива и „карциномом без означеног специфичног типа“, односно „карциномом без даљег одређивања“. Углавном, изазива дезмопластичну реакцију, те нормално масно ткиво дојке бива замењено тврдим, палпабилним везивним ткивом, које при мамографском снимању даје утисак повећане густине. Хистопатолошки, реч је о веома хетерогеном облику инвазивног карцинома дојке, који може имати развијене тубуларне структуре, чија су једра ниског степена градуса или се може састојати од анапластичних ћелија, распоређених у тракама. Ивице тумора су често неправилне, али исто тако могу бити и циркумскриптне, те потискују околно здраво ткиво дојке. Неретко, учава се и инвазија туморских ћелија у лимфоваскуларне структуре или њихово ширење дуж нерава. Узнапредовале форме инвазивног дукталног карцинома могу да доведу до увлачења коже, ретракције брадавице или фиксирања дојке за зид грудног коша (10).

Карцином дојке се најчешће дијагностикује на левој дојци, док код око 4% особа се овај карцином јавља билатерално или постоји више туморских маса у истој дојци, а који се секвенционално развијају. Према локализацији, скоро половина случајева карцинома дојке се дијагностикује у горњем спољашњем квадранту, око 20% у централној регији, док се за учесталосту од приближно око 10% појединачно карцином дојке локализује у горњем унутрашњем, доњем спољашњем и доњем унутрашњем квадранту (10).

На прогностички карактер карцинома дојке могу да испоље утицај многи фактори, од којих су најзначајнији (21): 1) величина примарног карцинома (карциноми мањи од 1 cm у пречнику имају бољу прогнозу, уколико нема регионалних лимфних метастаза); 2) захваћеност лимфних чворова и број захваћених лимфних чворова метастатским депозитима (петогодишња стопа преживљавања је око 90% уколико нису захваћени подпазушни лимфни чворови, док је стопа преживљавања мања од 50% уколико је



захваћено преко 16 лимфних чворова подпазушне јаме); 3) удаљене метастазе (хематогена дисеминација метастатских депозита); 4) градус (степен) карцинома (критеријуми за дефинисање диференцијације карцинома дојке су најчешће формирање тубула, нуклеарни градус и релативни број митоза; добро диферентовани карциноми дојке имају бољу прогнозу у поређењу са слабо диферентованих облицима); 5) хистолошки тип карцинома (инвазивни дуктални карцином има лошу прогнозу у поређењу са специјализованим типовима, попут тубуларног, медуларног, крибриформног итд.); 6) анеуплоидија (карциноми са абнормалним садржајем ДНК молекула имају лошију прогнозу од карцинома који имају садржај ДНК сличан оном у нормалној ћелији); и 7) прекомерна експресија HER-2.

Прогноза карцинома дојке значајно зависи и од стадијума у коме је карцином класификовати, у складу са TNM класификацијом („Т“ означава величину тумора, „N“ захваћеност и број захваћених регионалних лимфних чворова, док „M“ означава присуство удаљених метастаза) на следеће стадијуме:

- стадијум 0 означава карцином *in situ*, код кога нема јасних палпабилних нодуса;
- стадијум I означава тумор до 2 cm у пречнику, без видљивих метастаза;
- стадијум II означава тумор величине до 5 cm, са метастатским депозитима у регионалним лимфним чворовима;
- стадијум III означава карцином дојке већи од 5 cm у пречнику који инфилтрише околно ткиво, са појавом лимфогених метастатских депозита; и
- стадијум IV означава малигну неоплазму дојке који може бити било које величине, уз присуство хематогених и удаљених метастаза (22).

Имајући у виду наведено, карцином дојке откривен у стадијуму 0 има добру прогнозу, карцином дојке откривен у стадијуму I има петогодишњу стопу преживљавања код 80% пацијенткиња, у стадијуму II 65%, стадијуму III 40%, док у стадијуму IV петогодишња стопа преживљавања износи свега 10% (22).

## 1.4 Апоптоза

Апоптоза је, у основи, механизам програмски детерминисане смрти ћелије, који је регулисан строгим механизмима, а током кога ћелија преодређена за умирање активира сопствене ензиме који имају способност да деградирају сопствени једарни ДНК молекул, односно једарне и цитоплазматске протеине. Реч је о најизраженијем и, до сада, најбоље проученом облику програмиране ћелијске смрти, који има изузетно важну улогу у нормалном развоју ткива у организму, хемостази ткива, али и у патогенези различитих патолошких процеса. Иако и апоптоза и некроза спадају у облике ћелијске смрти, битно је напоменути да се апоптоза у потпуности разликује од насилне (трауматске) ћелијске смрти, односно некрозе. Ове разлике подразумевају и одсуство инфламаторног процеса током апоптозе, који је увек присутан код некрозе као последица губитка интегритета ћелијске мембране и ензимске дигестије ћелија, те истицања ћелијског садржаја у екстраћелијски простор (23). С тим у вези, 2011. године је извршена редефиниција типова ћелијске смрти, која, уместо дотадашње класичне поделе ћелијске смрти на апоптозу, некрозу и аутофагију, ћелијску смрт сада дели на унутрашњу (зависна или независна од протеина из породице каспаза) апоптозу, спољашњу апоптозу, некрозу, аутофагију и митотску катастрофу (24).

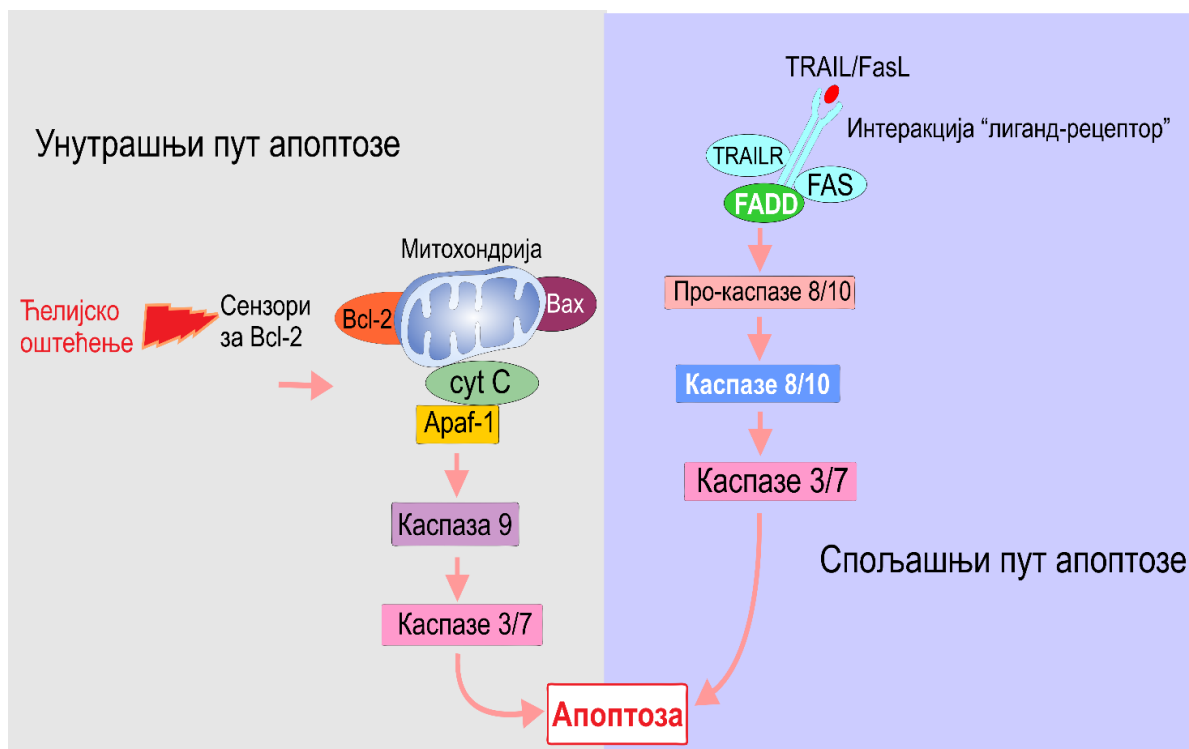
Као што је напоменуто, апоптоза се у организму одиграва у многим физиолошким стањима, са циљем да се у нормалним условима елиминишу остареле, али и оштећене

ћелије, чиме се одржава стални број ћелија у организму (10). Пример томе је апоптоза током органогенезе (обликовање многих ткива и органа у ембрионалном периоду, стварање шупљина у шупљим органима и каналима, развојна инволуција итд.), као и апоптоза код одраслих особа у тзв. хормон-зависним ткивима (нпр. пропадање ендометријума за време менструационог циклуса код жена, атрезија оваријалних фоликула у периоду менопаузе, регресија дојке након периода лактације и сл.). Такође, апоптоза се, као физиолошки процес, одвија у развијајућем тимусу, током пролиферације и диференцијације имунских ћелија (Т- и Б-лимфоцита), у току хематопоезе итд (10, 25). Када је реч о патолошким процесима, апоптоза има за циљ да уклони генетски измењене ћелије, али и ћелије оштећене у току регенерације, без изазивања значајне реакције домаћина, што је позитивно јер се здраво ткиво максимално штеди од оштећења. Ово је нарочито значајно код оштећења ДНК молекула директним или индиректним (посредством слободних радикала) путем, што се дешава током терапије ћелија зрачењем, деловања антитуморских лекова, изложености екстремној температури, па чак и током хипоксичних стања (25,26). Наиме, у наведеним стањима уколико ћелија није у стању да покрене репараторни процес, активирају се унутрашњи механизми који индукују процес апоптозе, јер је елиминација таквих ћелија бољи избор, у односу на ризик који са собом носе мутације у оштећеном ДНК молекулу, са могућношћу прогресије у малигну ћелијску трансформацију. С друге стране, код оштећења ћелија током трајања неких инфективних процеса, а нарочито оних изазваних вирусима, долази до губитка инфицираних ћелија апоптотским процесом, а који индукују или сами вируси (нпр. аденовируси) или имунолошка одбрамбена реакција домаћина, што је случај код вирусног хепатитиса. Такође, апоптоза је значајна и за елиминацију ћелија у којима је дошло до акумулације погрешно склопљених протеина, као последица мутација у генима који кодирају синтезу тих протеина, али и деловања слободних радикала, односно спољашњих фактора (10,23,26).

У основи механизма апоптозе налази се активација ензима из фамилије каспаза, односно цистеин-протеиназа које цепају ћелијске протеине након аспартатних резидуа, а то последично доводи до активације нуклеаза, које касније фрагментишу ДНК молекулу, али и бројних других молекула који разграђују протеине цитоскелета, нуклеопротеине ћелије итд (10,27). Каспазе се у организми синтетишу у свом неактивном облику, а моменат њихове активације је везивање цистеина за активно место на каспазама. Активација ензима каспаза је резултат прецизно избалансираног односа између проапоптотских и антиапоптотских молекуларних путева. Данас се зна да постоје два различита пута активације апоптозе, која воде ка активацији ензима каспазе, а то су унутрашњи (митохондријски) пут и спољашњи активације (пут рецептора смрти) - слика 4. Дакле, разлика између наведена два пута се односе на начин активације ензима из фамилије каспаза, али ће се након активације оба пута срести на нивоу извршних каспаза, које иницирају многобројне биолошке процесе, чији је резултат ћелијска смрт (10). С тим у вези, каспазе од значаја за апоптотски процес се могу класификовати на иницијалне каспазе и ефекторске каспазе (27,28). У иницијалне каспазе спадају каспазе тип 2, 8, 9 и 10, док у се у ефекторске каспазе сврставају каспазе тип 3, 6 и 7. Уопштено посматрано, каспазе се у организму налазе у свом неактивном облику (у облику прокаспаза), и то као мономерне јединице са инактивним доменима. До превођења неактивног у активни облик, односно прокаспаза у каспазе, долази захваљујући димеризацији, која се одвија везивањем адаптерних протеина за продомене на каспазама. Такође, поред каспаза, у апоптотском процесу су значајни Bcl-2 протеини који, у ствари, представљају унутарћелијске регулаторе апоптозе. Ова група протеина се, даље, класификује на проапоптотску групу, која стимулише процес апоптозе (Bax, Bak, Bad,

Bim, Bik, Bid, Hrk, Bcl-Xs итд.) и антиапоптотску групу, која инхибише апоптотски процес (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1, Bcl-W итд.) (27-30).

1. Унутрашњи (митохондријски) пут активације апоптозе је одговоран за апоптозу у највећем броју случајева и регулисан је са више од 20 различитих протеина, међу којима је, свакако, назначајнији Bcl-2 протеин. Наиме, у стањима када је ћелија изложена дејству фактора који оштећују ДНК молекул или се у ћелији акумулира абнормална количина мутираних протеина, долази до повећане пропустљивости на спољашњој мембрани митохондрија, дејством проапоптотских протеинских чланова фамилије који се називају Вах и Вак. Наведени проапоптотски протеини димеризују, уграђују се у митохондријалну мембрану, формирајући канале кроз које ће цитохром Ц и други митохондријални протеини изаћи из унутрашњости митохондрије у цитосол ћелије. Ослобођени цитохром Ц и други протеини митохондрија сада активирају у цитосолу ензим каспазу тип 9, а неки протеини истовремено блокирају активност антагониста каспаза, који представљају биолошке инхибиторе процеса апоптозе. Као крајњи резултат овог процеса, долази до активације каспазне каскадне реакције која доводи до фрагментисања једра ћелије. Супротно наведеном, уколико је ћелија изложена сигнаlima за преживљавање или факторима раста, синтетисаће се антиапоптотски протеини Bcl-2 који имају антагонистички ефекат на Вах и Вак протеине, чиме се ограничава излазак цитохрома Ц и других проапоптотских протеина из митохондрије (10, 31-34).



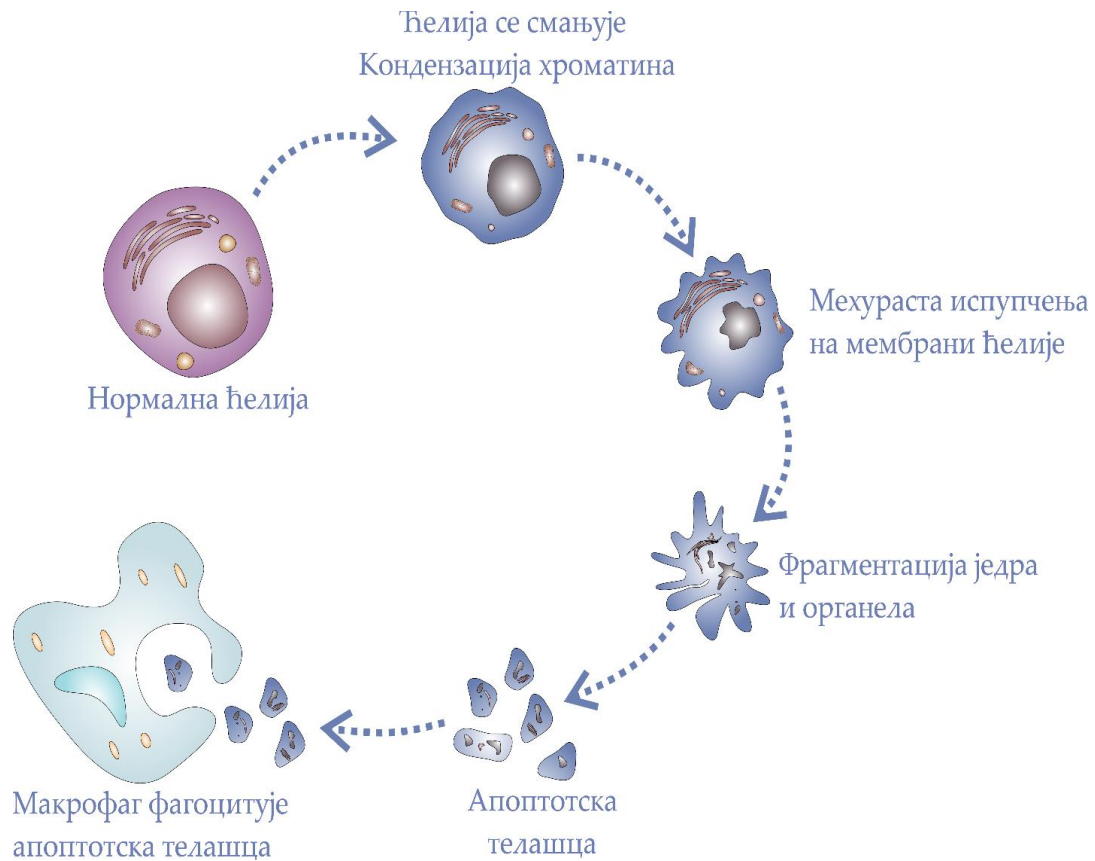
*Слика 4. Схематски приказ унутрашњег и спољашњег пута активације апоптозе (адаптирано на основу реф.10)*

2. Спољашњи пут активације апоптозе (пут рецептора смрти) је одговоран за уклањање аутореактивних лимфоцита, те уништавање „таргет“ ћелија од стране појединих цитотоксичних Т-лимфоцита. Овај пут активације апоптозе се одвија преко тзв. рецептора смрти који припадају фамилији рецептора фактора туморске некрозе (TNF), а међу којима су свакако значајнији тип ITNF рецептора и Fas-лиганд (CD<sub>95</sub>). Fas-лиганд се експримира на активираним Т-лимфоцитима и активира ензим каспазу тип 8 и тип 10, што последично даље води ка каскадној реакцији каспазне активације. Наиме, активирање иницијалних каспаза (тип 8 и тип 10) утиче на даљу активацију каспаза тип 3 и тип 7, односно ефекторских каспаза. Оно што је значајно нагласити јесте да ензим каспаза тип 8 може да изврши и активацију, те цепање Bid-a (проапоптотски члан из фамилије Bcl протеина) и тиме ћелију уводи у унутрашњи (митохондријски) пут активације апоптозе. Ова комбинација спољашњег пута активације апоптозе и митохондријског пута активације апоптозе је апсолутно смртоносна за ћелију. Такође, ћелијски протеин који је најзначајнији каспаза-антагонист, те блокира њихову активност на путу нисходног преношења сигнала од рецептора смрти је FLIP, а чије хомологе производе поједини вируси, па се сматра да то може бити један од потенцијалних механизма на основу којег вируси успевају да опстану у животу унутар инфициране ћелије (10, 30, 35-38).

Без обзира да ли је апоптоза активирана унутрашњим (митохондријским) путем или спољашњим путем (путем рецептора смрти), у оба случаја се, дакле, активирају ефекторске каспазе (капаза тип 3 и каспаза тип 7). Оне, по својој активности, улазе у једро, преко једрове мембране, те започиње деградициона фаза процеса апоптозе. У овој фази, каспаза тип 3, али и друге активирание каспазе, доводе до деградиције многобројних структурних протеина, међу којима се посебно истичу актин, фодрин, али и деградиције филаментних протеина, сигналних протеина, те протеина који учествују у регулацији транскрипције и репликације ДНК молекула, као и протеине који учествују у регулацији метаболизма ДНК молекула и РНК молекула. Крајњи стадијум апоптотског процеса је фрагментација ДНК молекула од стране ензима из групе ендонуклеаза (10,39-42). Ендонуклеазе представљају ензиме из групе хидролаза, који учествују у катализацији разградње интернуклеитидних веза унутар нативних, али и денатурираних, молекула ДНК. С тим у вези, битно је нагласити да се последњих година значајно говори о ендонуклеазама као основним егзекуторима процеса апоптозе, одговорним за фрагментацију ДНК молекула у апоптотском процесу (10,39-43).

По активацији апоптозе, било унутрашњим (митохондријским) путем активације, било спољашњим путем активације (путем рецептора смрти), у првој фази ћелија губи специјализоване мембране структуре (миковиле и ћелијске спојнице) и одигравају се карактеристичне промене на нивоу једра - слика 5. Наиме, долази до кондензације хроматина, најчешће у виду полумесеца уз мембрану једра, те се смањује величина једра, услед дезинтеграције једарцета. Уједно, смањује се и запремина ћелије, уз згушњавање цитоплазме и компактније згомилавање цитоплазматских органела. Овде је битно напоменути да постоји очуваност структурног интегритета већине ћелијских органела, нарочито митохондрија, што је један од значајних показатеља апоптозе. У следећој, другој, фази долази до деформације једра, са настанком малих протрузија, као и појавом мехурастих испупчења, која ће се одвојити од ћелије и формирати тзв. апоптотска телашца која су ограничена мембраном. У апоптотским телашцима се налазе цитоплазматски делови, са очуваним органелама, а ређе су присутни и фрагменти једра. Врло брзо, апоптотска телашца бивају фагоцитована од стране околних интактних ћелија

или макрофага. Апоптотски процес је, у суштини, врло систематичан; самоубилачке ћелије уредно кидају своје хромозоме, а потом се поједини ћелијски елементи пакују у апоптотска телашца и користе за рециклажу у суседним, очуваним ћелијама (10, 23-26, 43-45).



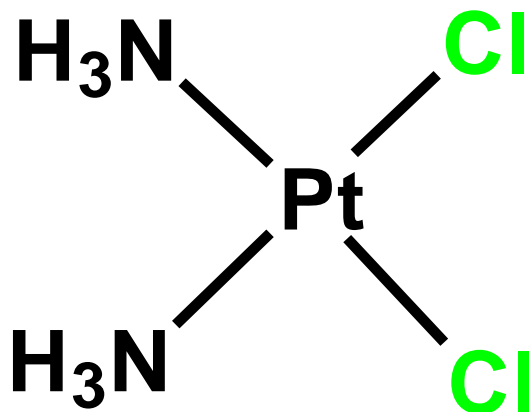
**Слика 5.** Схематски приказ одвијања процеса апоптозе (адаптирано на основу реф.10)

Дакле, кључни догађаји у процесу апоптозе су:

1. кондензовање хроматина и фрагментација ДНК молекула у делове величине нуклеозома;
2. промена облика и величине ћелије захваћене апоптозом (згушњавање ћелијске мембране, ћелијских органела и смежување ћелије);
3. формирање мехурастих испупчења на површини ћелије захваћене апоптозом и последични настанак апоптотских телашца; и
4. апоптоза апоптотских телашца од стране околних интактних ћелија или макрофага (10, 45).

## 1.5 Антитуморски лекови на бази јона метала

Развој антитуморских лекова на бази јона метала је затпочет пре више од пола века, случајним открићем антитуморског ефеката цисплатине (46). Цисплатина ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) или *cis*-диаминдихлордоплатина(II) је комплексно једињење јона платине(II) које је на собној температури постојано као жути прах, слабо растворан у води (слика 6) (47). Синтетисао га је *Peyron* 1844. године, док је његову хемијску структуру детаљно објаснио *Alfred Warner* тек 1893. године.



Слика 6. Хемијска структура цисплатине

Тек су 1960. године *Rosenberg* и сарадници утврдили да електролизом платинских електрода настаје једињење које има способност да инхибира ћелијску деобу *E. colli* (48), што је усмерило даља истраживања у правцу његове примене у хемиотерапији оболелих од малигнух тумора. Данас се једињење цисплатина користи у третману карцинома кранио-цервикалне регије, карцинома јајника, карцинома тестиса, карцинома плућа и карцинома мокраћне бешике (49). Његово цитотоксично дејство је у највећој мери резултат формирања интраланчаних ковалентних адуката са ДНК молекулом, и то између суседних база гуанина, чиме је заустављена репликација и/или транскрипција ДНК молекула (49). Међутим, примена овог комплекса платине(II) је ограничена, због бројних нежељених ефеката, као што су: 1) нефротоксичност; 2) неуротоксичност; 3) ототоксичност; 4) кардиотоксичност; 5) опадање косе; 6) наузеја; и 7) резистенција која је, нажалост, све заступљенија (50). У тежњи да се ограничена примена комплекса платине(II) превазиђе, последњих година су синтетисана бројна комплексна једињења платинске групе метала, између којих и комплекси паладијума(II), са различитим лигандима, а за које се очекивало да имају бољи цитотоксични капацитет, као и мању учесталост нежељених ефеката код онколошке групе пацијената.

### 1.5.1 Паладијум

Паладијум је хемијски елемент који је давне 1803. године открио британски лекар и хемичар *William Hyde Wollaston*. У периодном систему елемената, паладијум се налази у 10. групи и припада групи племенитих и изузетно ретких метала, заједно са рутенијумом, родијумом, осмијумом, иридијумом и платином. Може се наћи у елементарном стању, као и у саставу појединих руда (никл и бакар), али и у комбинованим лежиштима са легуром злата и сребра. У односу на све метале платинске групе, паладијум има најмању густину и најнижу тачку топљења. Велики редокс потенцијал доприноси растварању паладијума у оксикиселинама, попут концентроване вруће азотне киселине и сумпорне киселине, али и у царској води (51).

Реч је о металу који је сјајан, сивобеле боје и меке конзистенције, по изгледу и хемијским особинама подсећа на платину. Паладијум показује изузетну отпорност на корозију, тешко подлеже оксидативним процесима и поседује веома добру каталитичку моћ, што му омогућава широку промену у стоматологији, електротехници, аутомобилској индустрији, јувелирству, криминалистици, али и у хемијским истраживањима (52).

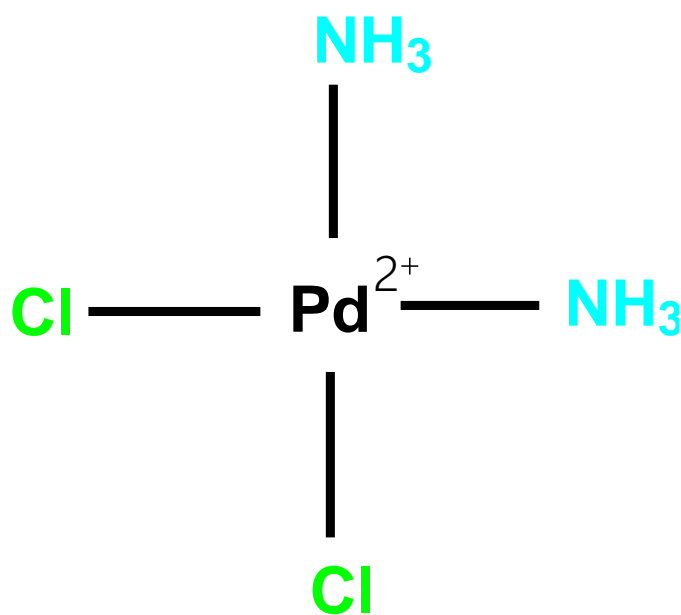
#### 1.5.1.1 Оксидационо стање +2

Комплексна једињења квадратно-планарне геометрије, са координационим бројем 4, најчешће гради паладијумов јон са оксидационим бројем +2. Ови комплекси подлежу и нуклеофилним и електрофилним реакцијама супституције, због присуства још два слободна места за координацију. Ова места у раствору могу заузети молекули растварача, при чему се механизам супституционих реакција одвија по асоцијативном механизму. Анјонски комплекс паладијума(II),  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ , који садржи четири хлоридо лиганда, представља полазни комплекс за синтезу осталих комплексних једињења овог јона метала. За разлику од хлоридо лиганда, бромидо ( $\text{Br}^-$ ) и јодидо ( $\text{I}^-$ ) лиганди, који су волуминознији, најчешће граде комплексе типа  $[\text{Pd}_2\text{X}_6]^{2-}$ . Осим анјонских, постоје и неутрални комплекси паладијум(II) јона,  $[\text{PdXYL}_1\text{L}_2]$ , где су X и Y анјонски лиганди, а  $\text{L}_1$  и  $\text{L}_2$  неутрални лиганди ( $\text{CO}$ ,  $\text{NR}_3$ ,  $\text{PR}_3$  и други). Број катјонских комплекса паладијума(II) је мали, при чему најчешће садрже аминске лиганде попут  $[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  и  $[\text{Pd}(\text{en})_2]^{2+}$  комплекса и добијају се директно у реакцији одговарајуће соли и лиганда.

#### 1.5.2 Комплексна једињења паладијума(II)

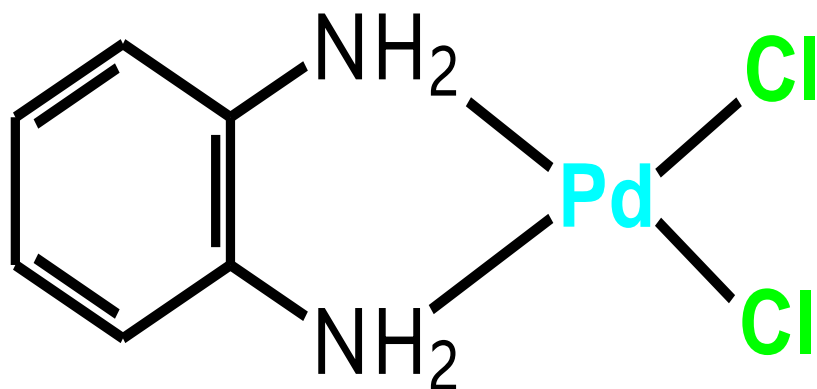
Као што је већ назначено, паладијум(II) има слична хемијска својства као и платина(II), те су и њихова комплексна једињења врло слична, што представља и разлог детаљнијег биолошког испитивања ових једињења. Управо због сличности са комплексима платине(II), чија је антитуморска активност већ потврђена, комплекси паладијум(II) се користе и као модел системи, на основу чијег деловања се може објаснити механизам деловања (антитуморског и токсичног) цисплатине и других платинских комплекса. Примарно синтетисани комплекси паладијума(II) представљали су структурне аналоге комплекса платине(II), *cis*- $[\text{PdCl}_2(\text{NH}_3)_2]$  (слика 7) и *cis*-

[PdCl<sub>2</sub>(dach)] једињења (слика 8) (53,54). Међутим, поменути паладијум(II) комплекси испољили су слабији антитуморски ефекат у поређењу са одговарајућим платина(II) комплексима. Наиме, у односу на одговарајуће комплексе платине(II), комплекси паладијума(II) су подложни процесу хидролизе, као и реакцији супституције координованих лиганда чак и до 10<sup>5</sup> пута брже, због чега не задржавају свој структурни интегритет у биолошким течностима довољно дуго да би достигли фармаколошке циљеве. Стога је правилан избор лиганда пресудан за модификацију реактивности, липофилност, али и стабилности самог комплекса паладијума(II). Због наведеног, временом су синтетисани броји комплекси паладијума са лигандима попут путресцина, спермина, лиганда edda типа и деривата куркукима (55,56), а чији је антитуморски ефекат скоро исти, односно и бољи од цисплатине. Утврђивањем биолошке активности етилендиаминских мононуклеарних комплекса паладијума(II) показано је појачано цитотоксично дејство на хуманој ћелијској линији леукемије (HL<sub>60</sub>) у односу на поједине комплексе платина(II), али и у односу на цисплатину (56). Такође, потврђено је да етилендиамински динуклеарни комплекси паладијум(II) јона у комбинацији са дериватима пиридина представљају носиоце антитуморске активности, те да, као такви, успешно редукују број хуманих туморских ћелија карцинома цервикса (HeLa) (57).



Слика 7. Хемијска структура *cis*-[PdCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

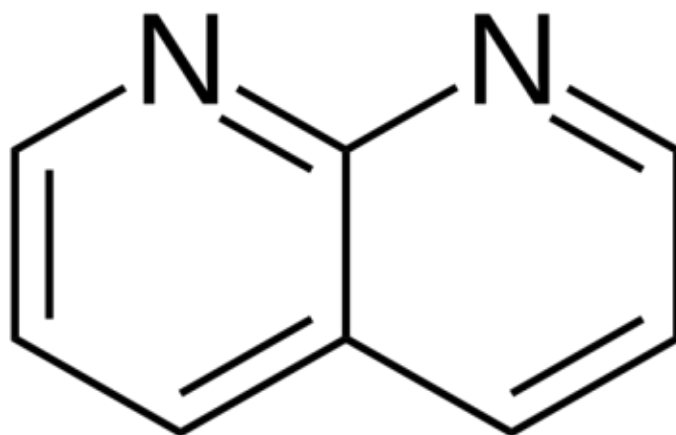




Слика 8. Хемијска структура  $cis-[PdCl_2(dach)]$

Бројни деривати 1,8-нафтиридина (слика 9) су показали различито антитуморско, антимиembroно и антиинфламаторно дејство. Дериват 1,8-нафтиридина чији је антитуморски потенцијал најшире испитан је ворелоксин (7-[(3*S*,4*S*)-3-метокси-4-(метиламино)пиридин-1-ил]-4-оксо-1-(1,3-тиазол-2-ил)-1,8-нафтиридин-3-карбоксилна киселина) (58). Уочен је и цитотоксични ефекат комплекса  $cis-[PtCl(NH_3)_2(naph)]NO_3$  (*naph* је 1,8-нафтиридин) на хуманим ћелијским линијама меланома (A<sub>375</sub>), цервикалног карцинома (A<sub>431</sub>), карцинома плућа (A<sub>549</sub>), панкреаса (ВхРС<sub>3</sub>) и колона (НСТ<sub>15</sub>, DLD<sub>1</sub>, LoVo и LoVo-OXP) (59). Антитуморска активност поменутог комплекса (IC<sub>50</sub> 1,11-6,21 μM) је била скоро једнака, али и већа од антитуморске активности једињења цисплатине (IC<sub>50</sub> 1,65-11,32 μM). Такође, ћелије хуманог карцинома колона (НСТ<sub>15</sub>) су најосетљивије на директно дејство овог нафтиридинског комплекса платине(II). Показано је да комплекс  $cis-[PtCl(NH_3)_2(naph)]NO_3$  има појачано цитотоксичко дејство на хумане туморске ћелије карцинома простате, које су резистентне на оксалиплатину (LoVo-OXP) (59).

Приликом анализе биолошке активности синтетисаних динуклеарних комплекса платине(II)  $[Pt(L)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)]^{2+}$  (L=2NH<sub>3</sub>; етилендиамин; 1,2-пропилендиамин; *trans*-1,2-диаминоциклохексан; 1,3-пропилендиамин; 2,2-диметил-1,3-пропилендиамин; 1,3-пентандиамин и 1,5-*nphe* = 1,5-нафтиридин) уочено је да су ћелије мишјег карцинома колона, дојке и плућа најосетљивије на дејство комплекса  $[PtCl(NH_3)_2]_2(\mu-1,5-nphe)]^{2+}$  и  $[Pt(en)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)]^{2+}$  (60). Остварени ефекти су ипак мањи у поређењу са ефектима цисплатине. Сви испитивани комплекси, за разлику од цисплатине, у знатно мањој мери редукују способност преживљавања мезенхимских матичних ћелија и хуманих фибробласта, што може указати на њихову потенцијално мању токсичност. Утврђивањем потенцијалног начина ћелијске смрти, утврђено је да поједини комплекси платине(II) индукују апоптозу туморских ћелија мишјег карцинома колона (60). Туморицидна активност одговарајућих комплекса паладијума(II)  $[Pd(L)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)]$  (L= етилендиамин; 1,2-пропилендиамин; *trans*-1,2-диаминоциклохексан; 1,3-пропилендиамин; 1,3-пентандиамин; 1,5-*nphe* = 1,5-нафтиридин) није до сада испитивана.



*Слика 9. Хемијска формула 1,8-нафтиридина*

## **2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА**

## A. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог истраживања био је да се испита потенцијално антитуморско дејство новосинтетисаних 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II). У складу са основним циљем, поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Потврдити састав синтетисаних комплекса паладијума(II) на основу резултата елементалне микроанализе;
2. Потврдити структуру синтетисаних комплекса паладијума(II) на основу њихових инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра;
3. Испитати потенцијални антитуморски ефекат новосинтетисаних 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II) у *in vitro* условима на ћелијским линијама колоректаног карцинома миша (CT<sub>26</sub>), меланома миша (B<sub>16</sub>F<sub>10</sub>), карцинома дојке миша (4T<sub>1</sub>), карцинома плућа миша (LLC<sub>1</sub>) и на мезенхималним матичним ћелијама (mMSCs);
4. Испитати потенцијални антитуморски ефекат новосинтетисаних 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II) у *in vitro* условима на ћелијским линијама хуманог колоректаног карцинома (HCT<sub>116</sub>), карцинома дојке (MDA-MB<sub>468</sub>) и карцинома плућа (A<sub>549</sub>);
5. Одредити релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија након излагања испитиваним комплексима;
6. Испитати потенцијални молекулски механизам проапоптотке активности 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II).

## B. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. На основу резултата елементалне микроанализе потврђен је састав добијених 1,5-нафтиридинских динуклеарних комплекса паладијума(II), при чему су експериментално добијене вредности заступљености одређених елемената у сагласности са теоријски израчунатим вредностима;
2. Лиганди су бидентатно координовани за јон метала, што је закључено на основу инфрацрвених и нуклеарно-магнетно резонанционих спектра;
3. Новосинтетисани 1,5-нафтиридински динуклеарни комплекси паладијума(II) редукују вијабилност туморских ћелија миша у зависности од дозе;
4. Новосинтетисани 1,5-нафтиридински динуклеарни комплекси паладијума(II) редукују вијабилност хуманих малигнућ ћелија у зависности од дозе;
5. Испитивани 1,5-нафтиридински динуклеарни комплекси паладијума(II) индукују апоптозу и/или некрозу туморских ћелија;
6. Испитивани 1,5-нафтиридински динуклеарни комплекси паладијума(II) мењају експресију проапоптотских и антиапоптотских протеина у туморским ћелијама.

### **3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ**

### 3.1 Синтеза $[\{\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-1,5-nphe})](\text{NO}_3)_2$ комплекса

Динуклеарни  $[\{\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-1,5-nphe})](\text{NO}_3)_2$  комплекси (L - бидентантно кординовани диамински лиганди етилендиамин; 1,2-пропилендиамин; *trans*-1,2-диаминоциклохексан; 1,3-пропилендиамин; 1,3-пентандиамин, 1,5-nphe - мостни лиганд 1,5-нафтиридин) добијени су по модификованом поступку.

У раствор  $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}_2]$  комплекса (L је етилендиамин (en), ( $\pm$ )-1,2-пропилендиамин (1,2-pn), *trans*-( $\pm$ )-1,2-диаминоциклохексан (dach), 1,3-пропилендиамин (1,3-pd), ( $\pm$ )-1,3-пентандиамин (1,3-pnd)) (0,300 mmol) у 5 mL DMF-а додато је 5 mL DMF раствора  $\text{AgNO}_3$ , кап по кап, у моларном односу 1:0,98 (49,94 mg, 0,294 mmol). Смеша је мешана преко ноћи, у мраку и на собној температури. После уклањања преципитата ( $\text{AgCl}$ ) филтрацијом, добијен бледо жути раствор  $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}(\text{DMF})]\text{NO}_3$  је даље коришћен за добијање потребних динуклеарних комплекса паладијума(II). Раствор 1,5-nphe лиганда у DMF-у (5 mL) је у капима додат у раствор  $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}(\text{DMF})]\text{NO}_3$  комплекса у моларном односу 1:2 (мостни лиганд:комплекс). Добијена смеша је мешана 4 сата у мраку на собној температури, а затим је упаравана на ротационом вакуум упаривачу. Запремина је смањена на 5 mL и након додавања 20 mL раствора дихлорметана, добијен је бледо жути талог одговарајућих  $\text{Pd}_1\text{-Pd}_5$  комплекса. Преципитат сваког комплекса је уклоњен филтрацијом, испран етром и осушен на ваздуху. Принос комплекса  $\text{Pd}_1\text{-Pd}_5$  био је између 50 и 60%.

#### 3.1.1. Карактеризација комплекса паладијума(II)

Карактеризација комплекса је извршена помоћу елементалне микроанализе, инфрацрвене и ултраљубичасте спектrophотометрије (IR, UV-Vis) и помоћу  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектроскопије.

Елементална микроанализа C, H и N параметара је одрађена на Микроаналитичком одељењу Института за хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду на апарату Vario III, H, N, S Elemental Analyzer (CHS мод).

Снимање инфрацрвених спектра је спроведено на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу на Perkin-Elmer FTIR 31725X спектrophотометру.

Снимање UV-vis спектра је одрађено на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на Snimadzu спектrophотометру, опремљеним термостатираним кварцном киветом Suprasil од 1,00 cm. Концентрација сваког динуклеарног паладијума(II) комплекса је износила  $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ .

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR) комплекса је, такође, спроведено на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, помоћу Varian Gemini-2000 NMR спектrophотометра. За снимање  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектра употребљени су  $\text{D}_2\text{O}$  и  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ) као растварачи и TSP (натријум-3-(триметилсиллил)-пропионат-2,2,3,3- $\text{d}_4$ ) као референтни стандард.

### 3.2. Ћелијске линије

Истраживање је реализовано као експериментална *in vitro* студија на следећим линијама малигнућ ћелија:

- мишији аденокарцином плућа LLC<sub>1</sub> (*Lewis Lung Cancer 1; American Type Culture Collection CRL-1642, ATCC, USA*),
- ћелијске линије мишјег меланома B<sub>16</sub>F<sub>10</sub> (*American Type Culture Collection CRL-6475, ATCC, USA*),
- ћелијска линија мишјег карцинома дојке 4T<sub>1</sub> (*American Type Culture Collection CRL-2539, ATCC, USA*),
- мишији карцином колона CT<sub>26</sub> (*American Type Culture Collection CRL-2638, TCC, USA*),
- ћелијска линија хуманог карцинома дојке MDA-MB<sub>468</sub> (*American Type Culture Collection ATCC® HTB-132™ USA*),
- ћелијска линија хуманог колоректалног карцинома HCT<sub>116</sub> (*American Type Culture Collection ATCC® CCL-247™ USA*),
- ћелијска линија хуманог карцинома плућа A<sub>549</sub> (*American Type Culture Collection ATCC® CCL-185™ USA*) и
- мишије мезенхимске матичне ћелије (*mMSC; Gibco Catalog number S1502-100*) изоловане из коштане сржи C<sub>57</sub>BL/6 мишева.

За култивацију наведених линија малигнућ ћелија миша коришћен је *Dulbecco* модификовани *Eagle* медијум (DMEM) у који су додати фетални говеђи серум, L-глутамин, пеницилин/стрептомицин и неесенцијалне аминокиселине. Малигне ћелије и mMSC су узгајане у инкубатору на 37°C са 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.3 Варијабле

Независне варијабле у овом истраживању су примена испитиваних комплекса паладијума(II) [ $\{Pd(L)Cl\}_2(\mu-1,5-nphe)](NO_3)_2$  (L= етилендиамин; 1,2-пропилендиамин; dach=trans-1,2-диаминоциклохексан; 1,3-пропилендиамин; 1,3-пентандиамин;) и цисплатине. С друге стране, зависне варијабле су процентни садржај С, Н и N, хемијско померање сигнала у NMR спектру изражено у јединицама ppm, положај сигнала у IR спектру изражено у јединицама cm<sup>-1</sup>, вијабилност ћелија. У истраживању нису постојале збуњујуће варијабле.

#### 3.3.1 МТТ тест

Вијабилност малигнућ ћелија у присуству новосинтетисанућ комплекса паладијума(II) испитивана је МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) колориметријским тестом. У метаболички активним ћелијама МТТ се редукује до љубичастих кристала формазана. Малигне ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка. Након тога, припремљена је ћелијска суспензија густине 3x10<sup>4</sup> ћелија/ml. У микротитар плоче са 96 бунара је сипано по 100µl ћелијске суспензије (3000 ћелија) по бунару. Након 24 сата у стандардним условима малигне ћелије су изложене новосинтетисаним комплексима паладијума(II) или референтном цитостатику (цисплатини) 48 сати у различитим довоструко растућим концентрацијама (3,9µM-500µM). Вијабилност ћелија приликом третмана је испитивана у трипликату у три

независна експеримента. По истеку 48 сати, додат је МТТ раствор (5 mg/mL у PBS-у (pH=7,2,)). Плоче су инкубирани 4 сата у стандардним условима (15). Оптичка густина (OD) је одређена на таласној дужини од 595 nm, на *Microplate multimode detector Zenyth 3100*.

Вијабилност ћелија је израчуната помоћу следеће формуле:

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = \frac{(\text{ћелије третиране испитиваном супстанцом}^{\text{апсорбанца}} - \text{контрола}^{\text{апсорбанца}})}{(\text{нетретиране ћелије}^{\text{апсорбанца}} - \text{контрола}^{\text{апсорбанца}})} \times 100$$

### 3.3.2 Анализа апоптозе

#### 3.3.2.1 Анализа проточном цитометријом ћелија третираних испитиваним комплексима паладијума(II) помоћу Annexin V и пропидијум јодида (PI)

Када ћелије у флашковима достигну конfluентност од око 70%, медијум се замењује медијумом са додатком испитиваних комплекса паладијума(II) у концентрацији која одговара вредностима IC<sub>50</sub>. Вредности IC<sub>50</sub> су добијене из претходне серије експеримента (МТТ тест). Контролне ћелије нису фармаколошки третиране. Након 24 сата инкубације ћелије су „опране“ комплетним медијумом и ресуспендоване у пуферу (10X пуфер: 0.1MHEPES, pH 7.4; 1.4MNaCl; 25mMCaCl<sub>2</sub>) до густине од 1.000.000 ћелија/ml. У 100µl добијене суспензије додато је по 5µl Annexin-a V-FITC (*BDPHarmingen, SanDiego, California, USA*) и 5µl PI (50µg/mlPBS-a) (*SigmaAldrich, Немачка*). После истека инкубације од 15 минута на собној температури и у мраку, у сваки узорак је додат по 400µl 1X пуфера. Анализирано је 20.000 догађаја на *FACS Calibur flowcytometer (BDBiosciences, SanJose, USA)*, а подаци су обрађени у *Flow Jo* програму (*TreeStar*). Анализом су дефинисани: Annexin V (-) и PI (-) као живе ћелије, Annexin V (+) и PI (-) као ћелије у раним фазама апоптозе, а Annexin V (+); PI (+) као ћелије у касним фазама апоптозе.

#### 3.3.2.2 Анализа експресије проапоптотских и антиапоптотских протеина проточном цитометријом

Малигне ћелије су инкубирани 24 часа у медијуму са додатим испитиваним комплексима паладијума(II), чија концентрација одговара вредностима IC<sub>50</sub>, или у чистом комплетном медијуму са контролним ћелијама. Након истека инкубације, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму до густине од 2x10<sup>6</sup>/ml. Након фиксације и пермеабилзације (*Fixation and Permeabilization Kit, BD Bioscience*), ћелије су инкубирани са моно- и поликлонским анти-мишјим антителима специфичним за кључне про- и антиапоптотске молекуле у цитосолу, а након тога са одговарајућим секундарним антителима коњугованим флуорохромом. Одговарајући број догађаја је анализиран на *FACS Calibur flowcytometer (BDBiosciences, SanJose, USA)*, а подаци су обрађени у *Flow Jo* програму (*TreeStar*).



### 3.4 Снага студије и величина узрока

Величина узорка је израчуната на основу вредности средње инхибиторне концентрације ( $IC_{50}$ ) комплексних једињења које су добијене у прелиминарним експериментима. Студијски узорак је израчунат узимајући  $\alpha$  као 0,05 и снагу студије од 0,8 за студентов  $T$ -тест (два независна узорка), упоређивањем групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G\*Power 3.1.9.4. На основу очекиване разлике у испитиваном параметру између група ( $IC_{50}$  на ћелијској линији НСТ<sub>116</sub>,  $C_1 = 91,59 \pm 15,21 \mu\text{M}$ ;  $C_2 = 59,32 \pm 9,83 \mu\text{M}$ ) утврђен је број понављања МТТ теста, који износи 3 за сваку од група.

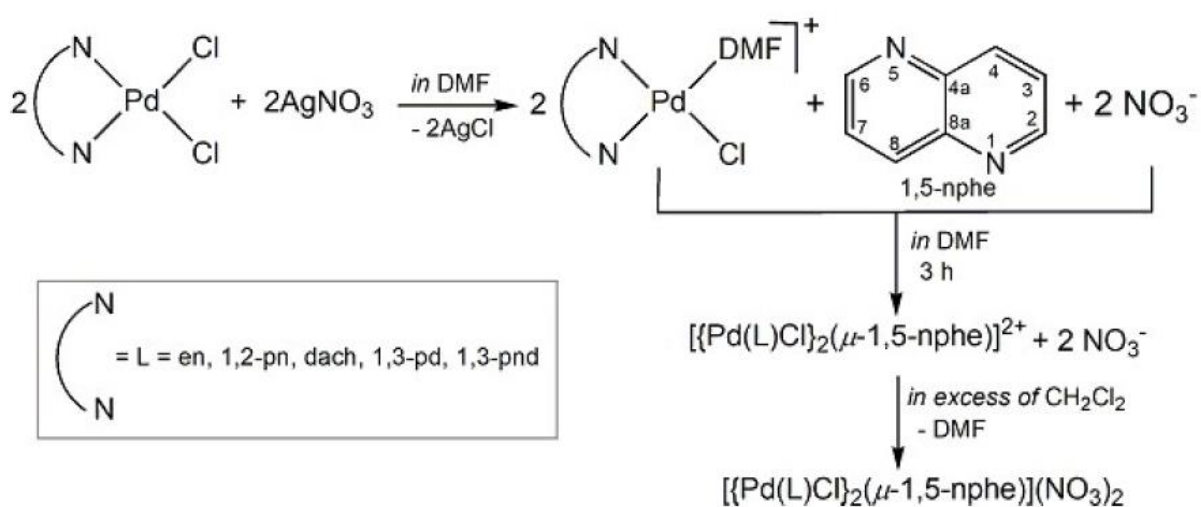
### 3.5 Статистичка обрада података

Статистички програм SPSS (верзија 20) је коришћен за анализирање података. Дистрибуција расподеле добијених података испитивана је пре статистичке обраде података. За вредности које су имале правилну расподелу, коришћен је параметарски студентов  $T$ -тест, а у случају неправилне расподеле података коришћењен је непараметарски *Mann-Whitney* тест. Резултати експеримената су изражени 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 структурна карактеризација динуклеарних паладијум(II) комплекса Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub>

Схематски приказ реакције синтезе Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплекса дат је на слици 10. Мононуклеарни комплекси Pd(II) припремљени су мешањем еквимоларних количина K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> и одговарајућег диаминског лиганда (L). Одговарајући интермедијерни [Pd(L)Cl(DMF)]<sup>+</sup> комплекси добијени су заменом једног јона хлора молекулом растварача диметилформаида (DMF) у реакцији између еквивалентне количине K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> комплекса са AgNO<sub>3</sub>. Динуклеарни Pd(II) комплекси са 1,5-нафтиридином као мостним лигандом добијени су као производ реакције одговарајућих [Pd(L)Cl(DMF)]<sup>+</sup> комплекса и 1,5-нафтиридина у молском односу 2:1.



**Слика 10.** Схематски приказ реакције синтезе динуклеарних  $[\{\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-1,5-nphe})]$  комплекса (L је етиледиамин, en; 1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; trans-(±)-1,2-диаминоциклохексан, dach; 1,3-пропилендиамин, 1,3-pd; 1,3-пентандиамин, 1,3-pnd, а 1,5-nphe је мостни лиганд 1,5-нафтиридин)

Структурне карактеристике Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> потврђене су елементалном микроанализом, помоћу NMR (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C), IR и UV-Vis спектроскопских метода. Покушаји да се добију кристални облици Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплекса из њихових аморфних прахова кристализацијом из различитих растварача (вода, метанол, ацетон, хлороформ и диметилформаид) били су неуспешни.

##### 4.1.1. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа је техника којом је потврђен степен чистоће синтетисаних паладијумским комплекса.

За **Pd<sub>1</sub>** (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pd<sub>2</sub>: FW =658.11):  
- Израчунато: C, 21.90%; H, 3.37%; N, 17.03%.  
- Нађено: C, 22.11%; H,3.26%; N, 17.19%.

За **Pd<sub>2</sub>** (C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pd<sub>2</sub>: FW =686.15):  
- Израчунато: C, 24.51%; H, 3.82%; N, 16.33%.  
- Нађено: C, 24.36%; H,3.71%; N, 16.58%.

За **Pd<sub>3</sub>** (C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pd<sub>2</sub>: FW =766.28):  
- Израчунато: C, 31.35%; H, 4.47%; N, 14.62%.  
- Нађено: C, 31.56%; H, 4.25%; N, 14.11%.

За **Pd<sub>4</sub>** (C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pd<sub>2</sub>: FW =686.15):  
- Израчунато: C, 24.51%; H, 3.82%; N, 16.33%.  
- Нађено: C, 24.28%; H, 3.55%; N, 16.53%.

За **Pd<sub>5</sub>** (C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Pd<sub>2</sub>: FW =742.26):  
- Израчунато: C, 29.13%; H, 4.69%; N, 15.10%.  
- Нађено: C, 28.98%; H, 4.31%; N, 14.92%.

#### 4.1.2 NMR карактеризација

NMR спектари динуклеарних комплекса паладијум(II), Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub>, и ароматичног *N*-хетероцикличног мостног лигананда, 1,5-нафтиридина, снимљени су на собној температури у деутерисаној води (D<sub>2</sub>O) као растварачу. Хемијска померања у <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектрима за некоординоване диаминске лиганде L и 1,5-нафтиридински лиганд су у сагласности са подацима из литературе (60-62).

##### Комплекс Pd<sub>1</sub>:

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 8,14 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>), 9,58 (d, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>8</sub>), 10,21 (d, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 130 (C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub>), 143 (C<sub>4a</sub>, C<sub>8a</sub>), 147 (C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>), 160 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>).

##### Комплекс Pd<sub>2</sub>:

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 8,23 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>), 9,56 (s, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>8</sub>), 10,18 (d, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 130 (C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub>), 143 (C<sub>4a</sub>, C<sub>8a</sub>), 146 (C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>), 160 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>).

##### Комплекс Pd<sub>3</sub>:

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, D<sub>2</sub>O, δ, ppm): 8,22 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>7</sub>), 9,45 (d, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>8</sub>), 10,16 (d, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , ppm): 130 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_7$ ), 143 ( $\text{C}_{4a}$ ,  $\text{C}_{8a}$ ), 146 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_8$ ), 160 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_6$ ).

#### Комплекс Pd4:

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , ppm): 8,23 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_7$ ), 9,55 (d, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_8$ ), 10,17 (d, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_6$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , ppm): 131 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_7$ ), 143 ( $\text{C}_{4a}$ ,  $\text{C}_{8a}$ ), 146 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_8$ ), 160 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_6$ ).

#### Комплекс Pd5:

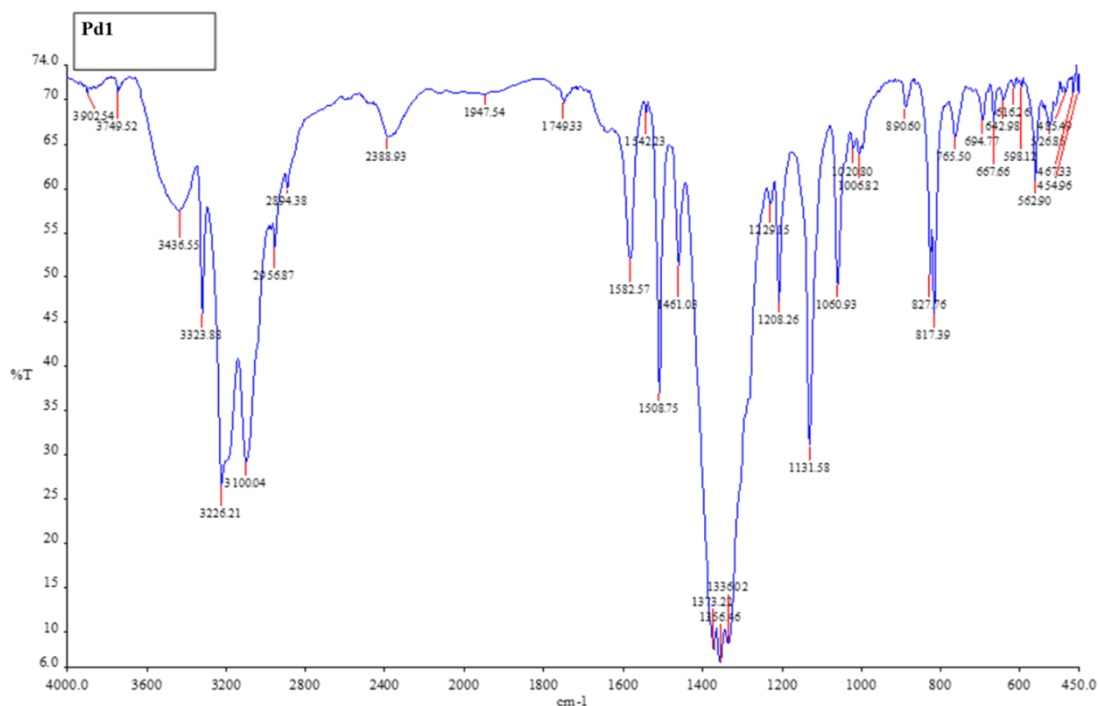
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , ppm): 8,14 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_7$ ), 9,55 (m, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_8$ ), 10,22 (d, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_6$ ).

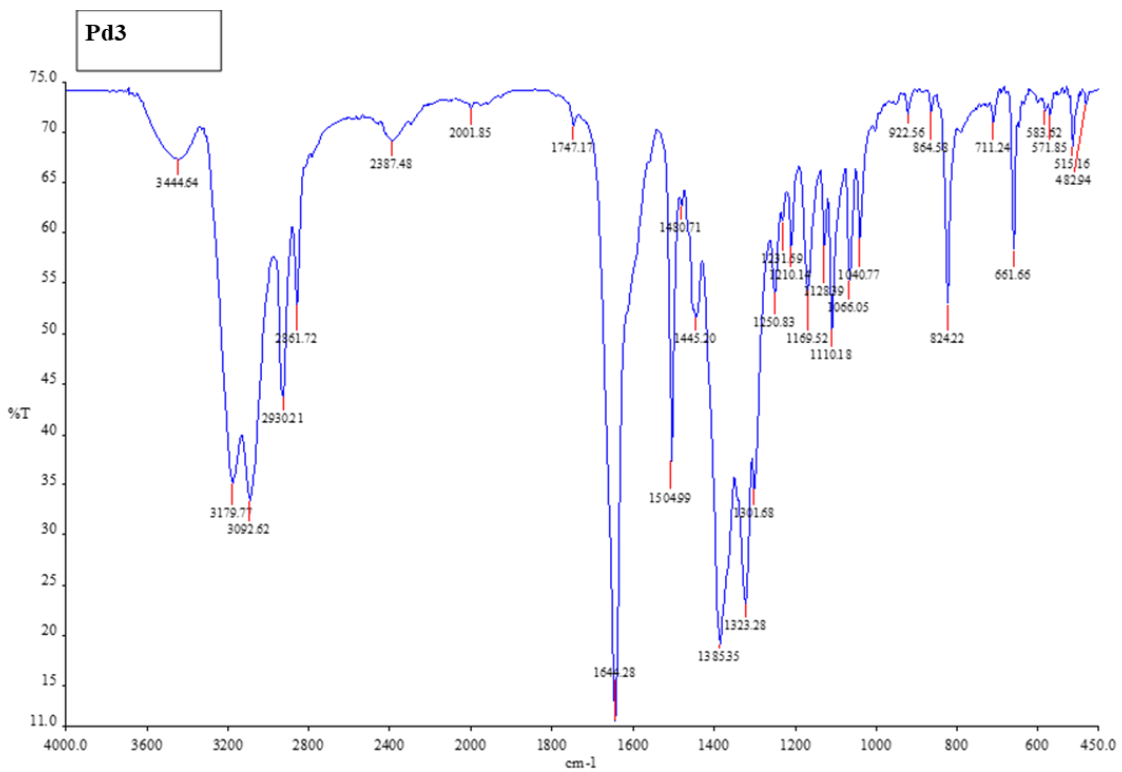
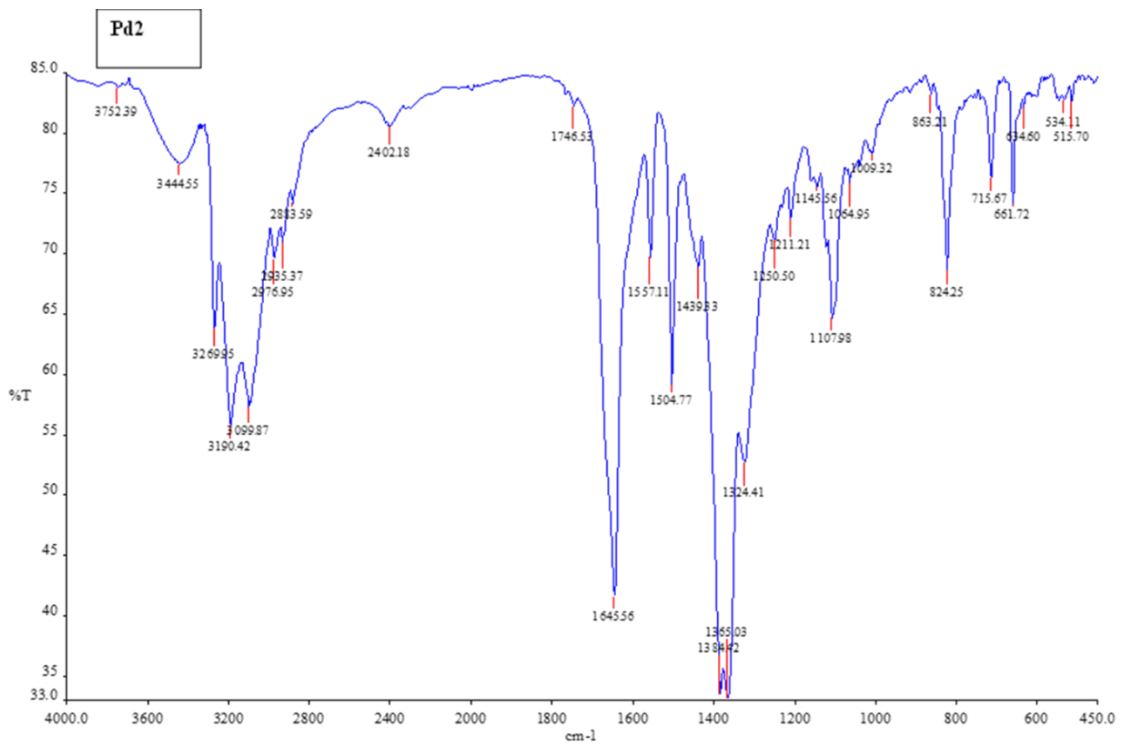
$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , ppm): 130 ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_7$ ), 143 ( $\text{C}_{4a}$ ,  $\text{C}_{8a}$ ), 147 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_8$ ), 161 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_6$ ).

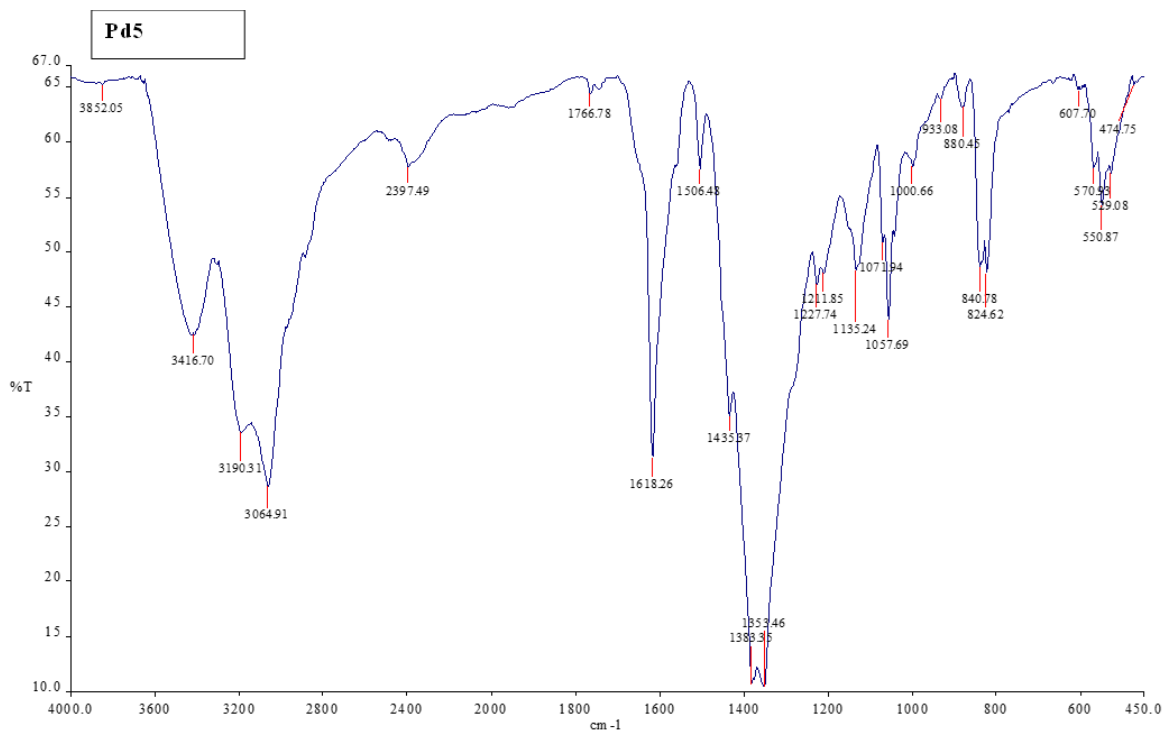
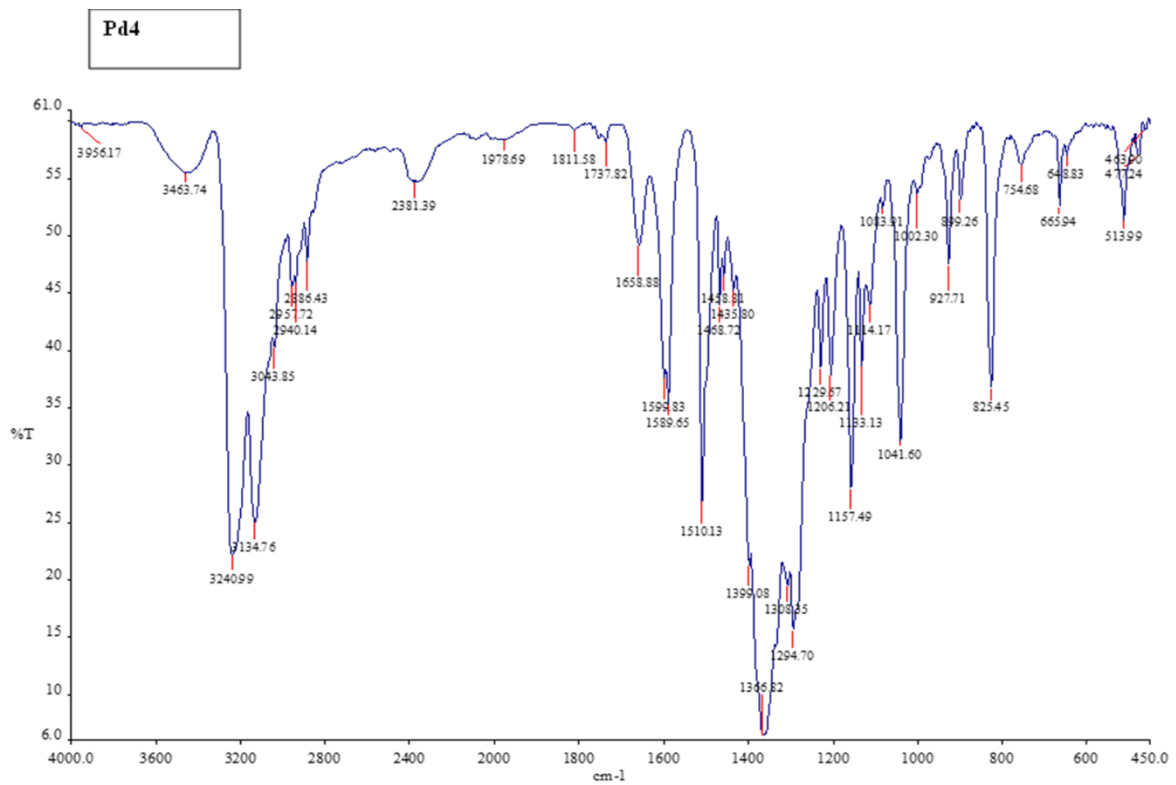
### 4.1.3 IR и UV-Vis карактеризација

IR спектри комплекса снимљени су на таласним дужинама  $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ . Траке које одговарају вибрацијама координованог мостног 1,5-нафтиридинског лиганда, бидентатно координованог диаминског лиганда и нитратног контра-јона јасно се могу уочити у IR спектрима - слика 11.

UV-Vis спектри снимани су у води, на таласним дужинама 200 - 900 nm и при концентрацији раствора комплекса од  $5 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ . Добијени електронски апсорпциони спектри садрже апсорпциони максимум ( $\lambda_{\text{max}}$ ) на око 290 - 296 nm који потиче од  $\pi \rightarrow \pi^*$  прелаза у 1,5-нафтиридинском лиганду.







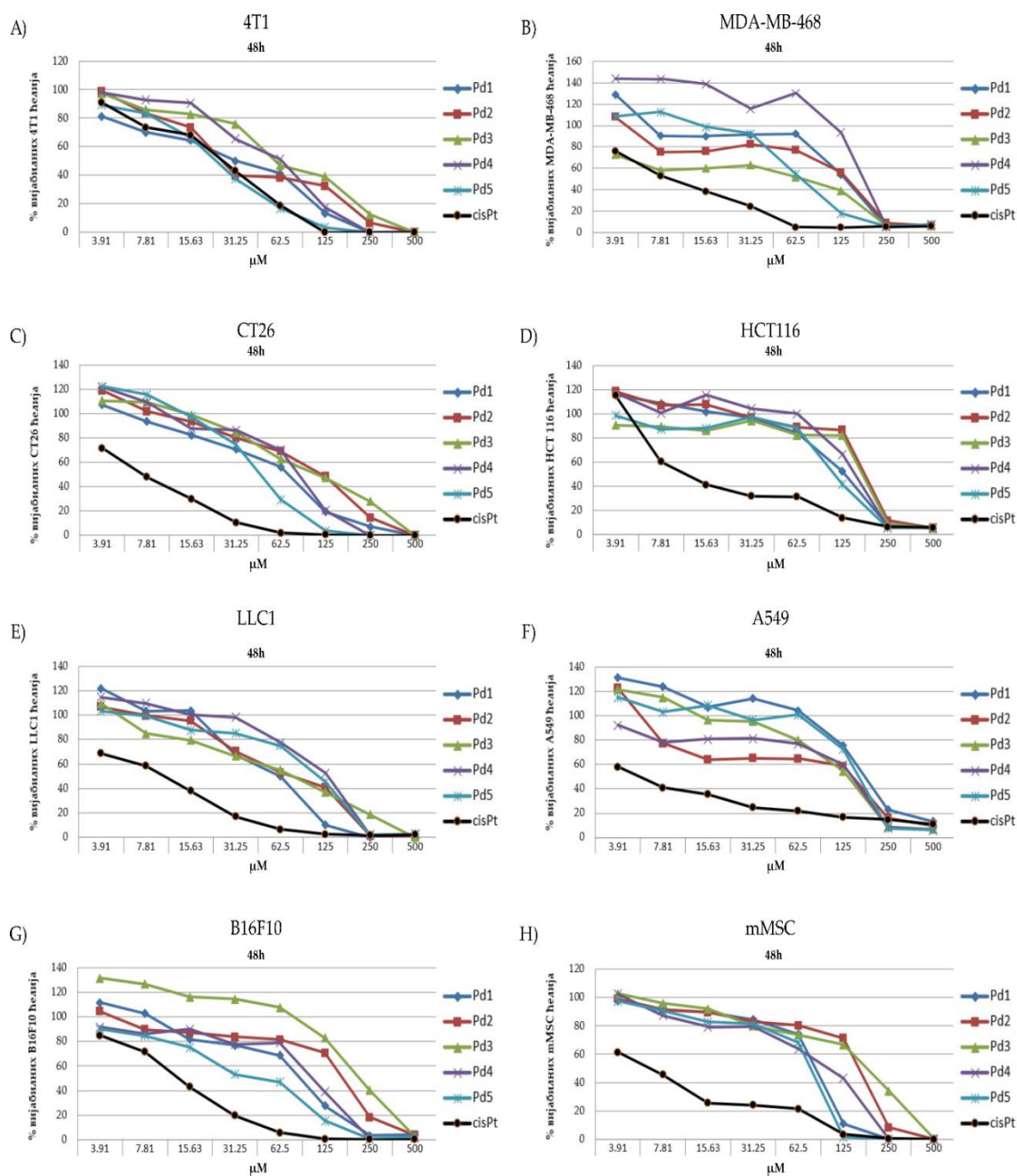
Слика 11. IR спектри Pd1-Pd5 комплекса, KBr, 4000-450  $\text{cm}^{-1}$

## 4.2 Цитотоксична активност комплекса Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub>

Цитотоксична активност новосинтетисаних динуклеарних комплекса Pd(II) (Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub>) тестирана је помоћу МТТ колориметријског теста на неколико линија ћелија: мишјем карциному дојке (4T<sub>1</sub>), мишјем карциному дебелог црева (СТ<sub>26</sub>), мишјем карциному плућа (LLC<sub>1</sub>), мишјем меланому (В<sub>16</sub>F<sub>10</sub>), хуманом карциному дојке (MDA-MB<sub>468</sub>), хуманом карциному дебелог црева (НСТ<sub>116</sub>) и хуманом аденокарциному плућа (А<sub>549</sub>).

Добијени резултати показали су да су сви тестирани комплекси Pd(II) смањивали одрживост ћелијских линија тумора у одређеним дозама. Међу тестираним комплексима, Pd<sub>5</sub> имао је највећи цитотоксични капацитет према ћелијама СТ<sub>26</sub>, НСТ<sub>116</sub>, А<sub>549</sub> и В<sub>16</sub>F<sub>10</sub>. LLC<sub>1</sub> ћелије биле су осетљиве на ефекат комплекса Pd<sub>1</sub>, док су ћелије MDA-MB-468 биле посебно осетљиве на присуство комплекса Pd<sub>3</sub> (слика 12). Свих пет тестираних динуклеарних комплекса Pd(II) имали су висок цитотоксични потенцијал према 4T<sub>1</sub> ћелијама (слика 12). Занимљиво, анализа IC<sub>50</sub> вредности показала је да су сви тестирани комплекси Pd(II) били пар пута мање активни у поређењу са цисплатином, референтном леку на бази комплекса јона метала. Изузетак је био ефекат на 4T<sub>1</sub> ћелије. У већим количинама (15,63-500μМ) Pd<sub>5</sub> комплекса смањена је одрживост 4T<sub>1</sub> ћелија на сличан степен као цисплатина, док је у мањим концентрацијама цитотоксичност Pd<sub>5</sub> значајно ослабљена (60). Супротно, ниже концентрације комплекса Pd<sub>1</sub> (3,91-15,63 μМ) смањивале су одрживост 4T<sub>1</sub> ћелија ефикасније него цисплатина, док у концентрацијама 15.63 μМ и више, цитотоксичност цисплатина је израженија (слика 12). У складу са претходним резултатима није било значајне разлике у вредностима IC<sub>50</sub> према ћелијама 4T<sub>1</sub> за Pd<sub>5</sub> и цисплатину (Табела 6). Занимљиво, цитотоксични ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) са истим лигандима били су значајно мањи. Када је у питању контрола тестирања ћелијских линија, динуклеарни комплекси Pd(II) показали су мању цитотоксичност према mMSC у поређењу са референтним леком на бази комплекса јона метала.





**Слика 12.** Цитотоксични ефекат комплекса Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> на ћелијске линије након 48 сати, MTT тест. А) 4Т1 ћелијска линија; В) MDA-MB-468 ћелијска линија; С) CT26 ћелијска линија; Д) HCT116 ћелијска линија; Е) LLC1 ћелијска линија; Ф) A549 ћелијска линија; Г) B16F10 ћелијска линија; Н) mMSC ћелијска линија

**Табела 6.**  $IC_{50}$  вредности за комплексе  $Pd_1$ - $Pd_5$  на различитим ћелијским линијама изложених 48 сати, третираних ММТ тестом путем три независна експеримента

Једињење	$IC_{50} \pm SD (\mu M) (48h)$							
	4T1	MDA-MD-468	CT26	HCT116	LLC1	A549	B16-F10	mMSC
Pd1	28,25±8,63	102,73±7,8	54,44±1,99	107,34±2,02	56,03±1,46	192,23±1,92	67,14±1,92	59,28±3,09
Pd2	49,28±4,8	89,35±3,01	86,93±3,32	188,06±4,12	61,79±4,45	207,45±3,44	112,76±3,1	100,19±6,72
Pd3	56,61±6,17	31,40±2,24	103,74±6,71	118,45±5,61	62,26±3,37	105,67±1,48	225,79±3,81	137,93±9,96
Pd4	47,70±2,60	213,85±1,13	67,99±1,52	135,51±4,52	98,67±5,26	130,9±4,42	67,28±2,97	62,87±3,27
Pd5	24,12±2,17	70,06±3,22	52,65±2,02	91,405±3,21	83,56±2,44	152,85±4,98	36,27±7,84	61,51±1,29
cisplatin	19,17±1,83	9,19±1,7	5,74±0,84	23,92±1,68	10,91±1,36	4,47±1,09	13,38±3,28	5,1±2,13

Концентрације  $Pd(II)$  комплекса које могу проузроковати изумирање 50% mMSC ћелија најмање су 12 пута мање у поређењу са цисплатином. Индекс селективности пет третираних комплекса  $Pd(II)$  (табела 7) за сваку ћелијску линију миша израчунате су у складу са литературним подацима (63). Као што је приказано у табели 7, индекс селективности  $Pd$ -комплекса био је већи за карцином дебелог црева миша ( $CT_{26}$ ), карцином плућа миша ( $LLC_1$ ), меланом миша и поготово за ћелије карцинома дојке миша ( $4T_1$ ), у поређењу са цисплатином. Ово имплицира да иако комплекси  $Pd(II)$  показују мању цитотоксичност на различитим ћелијама тумора у односу на референтни лек на бази јона метала, имају већу селективност према мезенхијским матичним ћелијама. Највиши степен цитотоксичне селективности добијен је за комплекс  $Pd_5$ .

**Табела 7. Индекс селективности Pd(II) комплекса на различитим ћелијским линијама миша**

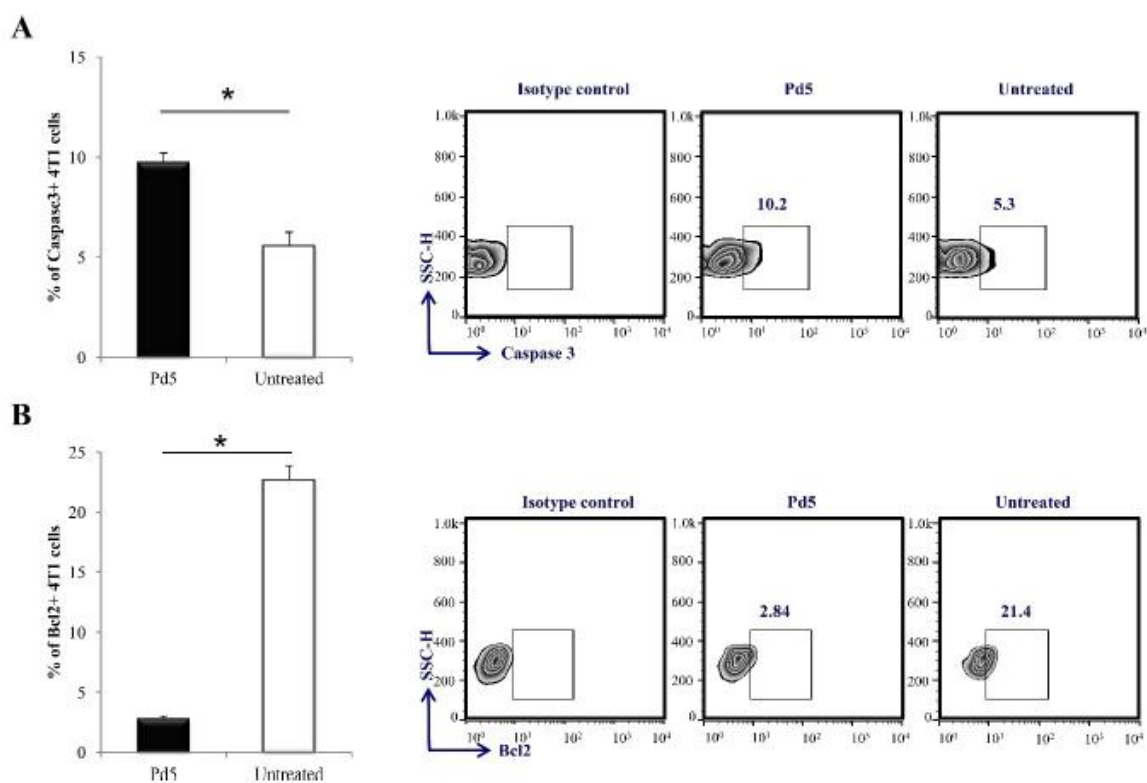
Једињење	Индекс селективности (IC <sub>50</sub> mMSC/ IC <sub>50</sub> )			
	4T1	CT26	LLC1	B16-F10
<b>Pd1</b>	2,098407	1,088905	1,058005	1,132591
<b>Pd2</b>	2,033076	1,152537	1,62146	1,125462
<b>Pd3</b>	2,436495	1,329574	2,215387	1,63699
<b>Pd4</b>	1,318029	0,924695	0,637174	1,070145
<b>Pd5</b>	2,550166	1,168281	0,736118	0,58966
<b>cisplatina</b>	0,266041	0,888502	0,467461	2,623529

Добро познат механизам дејства различитих једињења у поступку њиховог антитуморског дејства је индукција процеса изумирања ћелија карцинома, кроз процес апоптозе. Претходно је установљено, на основу публикованих резултата, да неки динуклеарни комплекси Pd(II) индукују апоптозу ћелијских линија карцинома (64-66).

Такође, скорашња истраживања показала су да динуклеарни Pt(II) комплекси са 1,5-нафтиридином као мостним лиганфом изазвају апоптотично изумирање ћелија CT<sub>26</sub> (60). Како би се одредио механизам деловања динуклеарних Pd(II) комплекса, анализирани су ћелије 4T<sub>1</sub> након двадесетчетворочасовног третмана коришћењем анексин 5 и пропидијум-јодида. Комплекс Pd<sub>5</sub> коришћен је као представник лека за овај експеримент, због његовог сличног цитотоксичног капацитета према ћелијама 4T<sub>1</sub>, као цисплатина (IC<sub>50</sub> 24,12 μM) и највишег степена цитотоксичне селективности. Као што се може видети на слици 13, Pd<sub>5</sub> комплекс је значајно повећао проценат рано апоптотичних ћелија 4T<sub>1</sub> (10,6%), као и касно апоптотичних ћелија 4T<sub>1</sub> (15,05%) у поређењу са нетретираним ћелијама (5,57% и 5,24%) ( $p < 0.05$ ). Иако је био мали проценат

некротичних ћелија 4T<sub>1</sub>, повећан проценат некротичних ћелија (AnnB@/Pi+) такође је посматран након двадесетчетворочасовног третмана комплексом Pd<sub>5</sub> у концентрацији 24,12 μM ( $p < 0.05$ ). Добијени резултати су показали да је Pd<sub>5</sub> комплекс погодан окидач за апоптотску и некротску смрт ћелија.

Да би се одредили узроци повећане апоптозе након третмана комплексом Pd<sub>5</sub>, анализирани су неки од кључних молекула повезаних са апоптозом користећи проточну цитометрију. Култивација ћелија 4T<sub>1</sub> са комплексом Pd<sub>5</sub> (24,12 μM) повећала је проценат каспазе тип 3+ ћелија (9,71% у односу на 5,53%) ( $p < 0.05$ , Слика 13 В), а смањила проценат Bcl-2+ ћелија (2,8% у односу на 19,84%) ( $p < 0.05$ ; Слика 13 А). Добијени резултати предлажу датретман комплексом Pd<sub>5</sub> олакшава апоптотично изумирање ћелија 4T<sub>1</sub> смањивањем антиапоптотског Bcl-2 протеина и повећањем проапоптотског типа каспаза, каспаза тип 3.



**Слика 13.** Експресија каспазе тип 3 и Bcl-2 током третирања комплексом Pd<sub>5</sub>. Каспаза тип 3 (А) и Bcl-2 (В) експресија у 4T<sub>1</sub> ћелијама након двадесетчетворочасовног третмана комплексом Pd<sub>5</sub> (24.12 μM) проточном цитометријом.

## **5. ДИСКУСИЈА**

У изради ове дисертације коришћени су новосинтетисани 1,5-нафтиридински динуклеарни комплекси паладијума(II),  $[\{Pd(L)Cl\}_2(\mu-1,5-nphe)](NO_3)_2$  (L - бидентантно координовани диамински лиганд = етилендиамин, en; 1,2-пропилендиамин, 1,2-pn; *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан, dach; 1,3-пропилендиамин, 1,3-pd; 1,3-пентандиамин, 1,3-pnd и као мостни лиганд 1,5-nphe, 1,5-нафтиридин). Цисплатина је коришћена као контролна фармаколошки активна супстанца на бази јона метала (контролни цитостатик).

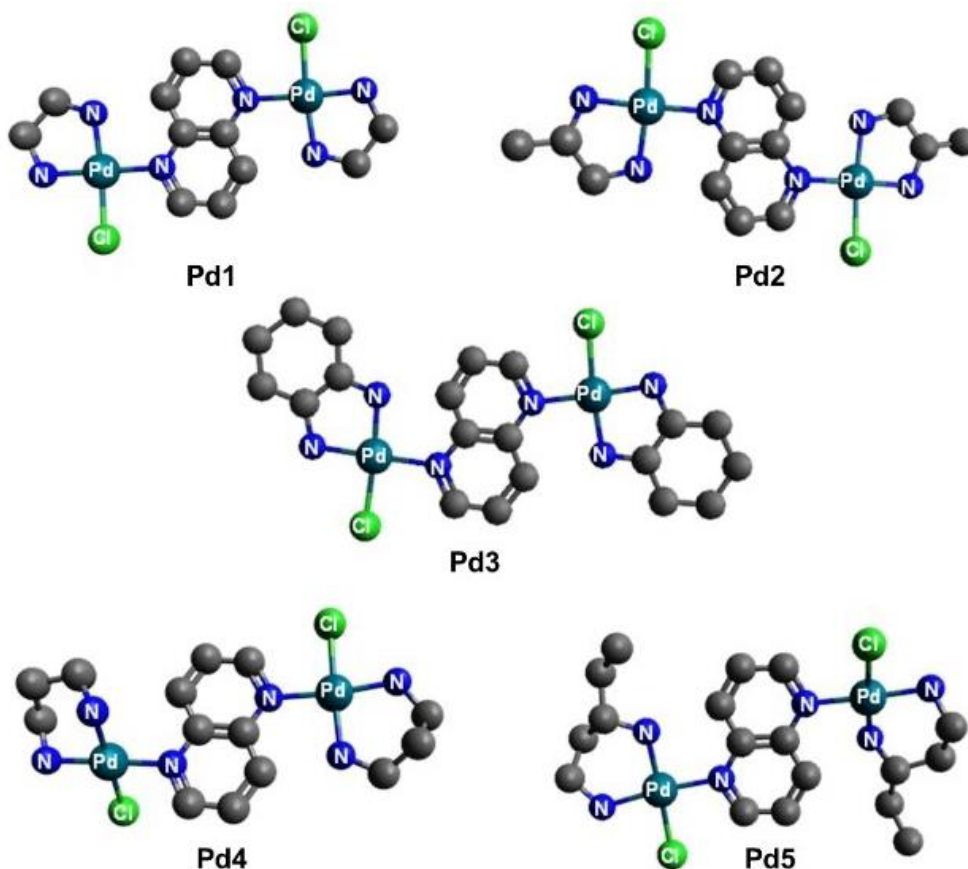
Упркос вишедеценијским напорима која су учињена на пољу развоја антитуморских агенаса, карциноми су и даље најчешћи узрок морбидитета и морталитета широм света (1). СЗО указује да је међу најчешће дијагностикованим карциномима у свету карцином дојке, карцином плућа, колоректални карцином, карцином простате, карцином коже и карцином абдоминалне регије (1). Највећа стопа морталитета у свету је од карцинома плућа, колоректалног карцинома, карцинома јетре, карцинома абдоминалне регије и карцинома дојке (1). Слична ситуација је и у нашој земљи, када је реч о морбидитету и морталитету од карцинома (2). Наиме, према јавно доступним информацијама Института за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“, стопа инциденције од рака у Републици Србији код мушкараца износи око 325 на 100.000 становника, док је код жена значајније нижа, 275 на 100.000 становника (2). Такође, стопа морталитета од карцинома је код мушкараца чак 165 на 100.000 становника, док је код жена она значајније мања - око 109 на 100.000 становника (2). Уједно, доступни подаци указују да је највећа стопа морталитета код мушкараца била од карцинома плућа и карцинома простате, док је код жена највећа од карцинома дојке, карцинома плућа и карцинома колоректалне регије (2).

У циљу побољшања антитуморске активности и смањења нежељених дејстава хемиотерапеутика који садрже јоне метала у својој структури, синтетисани су различити комплекси платинске групе метала.

## 5.1 Синтеза и карактеризација Pd<sub>1</sub>–Pd<sub>5</sub> комплекса

Пет диаминских лиганата, етилендиамин, 1,2-пропилендиамин, *trans*-1,2-диаминоциклохексан, 1,3-пропилендиамин и 1,3-пентандиамин, коришћени су као хелатни бидентатни лиганди за грађење одговарајућих комплекса паладијум(II) јона (67).

У свим динуклеарним комплексима Pd(II) две  $[Pd(L)Cl]$  јединице су повезане преко 1,5-нафтиридина (1,5-nphe) као мостног лиганда. Ароматични *N*-хетероциклични молекул, 1,5-нафтиридин, садржи два атома азота у два кондензована прстена на положајима 1 и 5, преко којих се координује за две  $[Pd(L)Cl]$  јединице формирајући одговарајући динуклеарни Pd(II) комплекс,  $\{[Pd(en)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)\}(NO_3)_2$  (**Pd<sub>1</sub>**),  $\{[Pd(1,2-pn)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)\}(NO_3)_2$  (**Pd<sub>2</sub>**),  $\{[Pd(dach)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)\}(NO_3)_2$  (**Pd<sub>3</sub>**),  $\{[Pd(1,3-pd)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)\}(NO_3)_2$  (**Pd<sub>4</sub>**) и  $\{[Pd(1,3-pnd)Cl]_2(\mu-1,5-nphe)\}(NO_3)_2$  (**Pd<sub>5</sub>**) (67). Сви комплекси добијени су као нитратне соли из воде. Комплекси Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>3</sub> имају формиран петочлани диамински прстен (en, 1,2-pn и dach), док Pd<sub>4</sub> и Pd<sub>5</sub> имају формиран шесточлани диамински прстен (1,3-Pd и 1,3-pnd) (слика 14).



Слика 14. Структурне формуле динуклеарних 1,5-нафтиридинских Pd(II) комплекса(66)

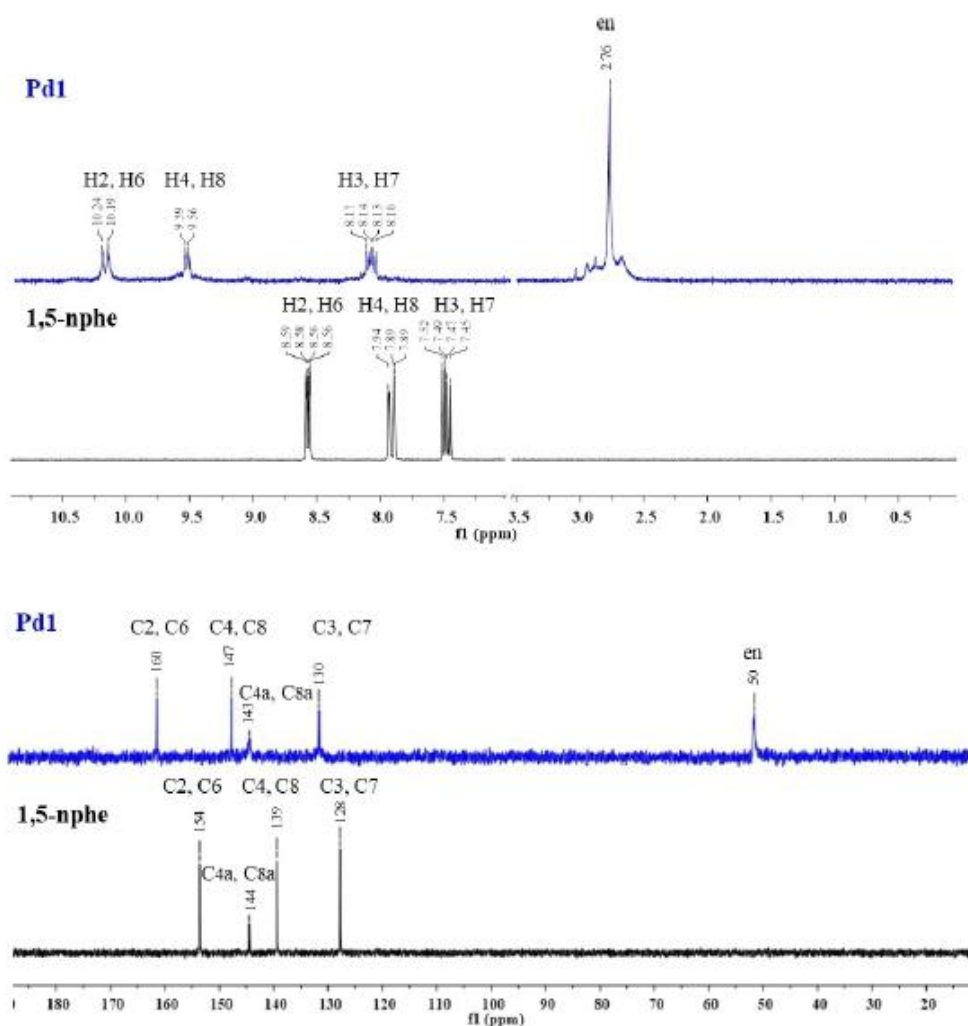
### 5.1.1 NMR спектроскопска карактеризација Pd<sub>1</sub>–Pd<sub>5</sub> комплекса

У ароматичној области <sup>1</sup>H NMR спектра *N*-хетероцикличног нафтиридинског мостног лиганда у Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплексима јављају се мултиплети (дублет-дублети, dd) на 7,48 ppm (за H<sub>3</sub> и H<sub>7</sub>), односно 8,57 ppm (за H<sub>2</sub> и H<sub>6</sub>), који одговарају еквивалентним протонима кондензованих пиридинских прстенова, док дублет на 7,89 ppm потиче од H<sub>4</sub> и H<sub>8</sub> протона (67). Након координације за Pd(II) јон сигнали протона ароматичних прстенова се померају ка нижем пољу, односно ка вишем хемијском померању. Сва померања се значајно разликују код некоординованог 1,5-*nph*e лиганда, што се може објаснити делокализацијом наелектрисања кроз кондензоване прстенове 1,5-нафтиридиновог лиганда (64,68,69).

Са друге стране, сви сигнали бидентатно координованих диаминских лиганда у динуклеарним паладијум(II) комплексима, такође, су померени ка нижем пољу у поређењу са истим за одговарајући некоординовани лиганд (67). <sup>1</sup>H NMR спектар комплекса Pd<sub>1</sub> садржи мултиплет на 2,76 ppm који потиче од протона CH<sub>2</sub> групе бидентатно координованог етилендиаминског лиганда и померен је ка вишем хемијском померању за Δδ = 0,12 ppm односу на слободан етилендиамин (слика 15). Метил, метилен и метински протони бидентатно координованог 1,2-пропилендиамина у Pd<sub>2</sub> комплексу дају три мултиплета на 1,30 ppm, 2,71 ppm и 3,24 ppm у алифатичном делу



спектра. У Pd<sub>3</sub> комплексу, хемијска померања протона у *dash* диаминском лиганду су померена ка nižем пољу дајући три сета мултиплета, на 1,31 ppm за H<sub>4</sub> и H<sub>5</sub>, 1,8 ppm за H<sub>3</sub> и H<sub>6</sub> метилен протоне, као и на 2,55 ppm за H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub> метинске протоне. Након координације 1,3-*pd* лиганда за Pd(II) јон у {[Pd(1,3-*pd*)Cl]<sub>2</sub>(μ-1,5-*nphe*)}<sup>2+</sup> комплексу, његова два мултиплета у <sup>1</sup>H NMR спектру су померена на 1,85 ppm и 2,60 ppm за H<sub>2</sub> и терминалне H<sub>1</sub> и H<sub>3</sub> метиленске протоне, по наведеном реду. Слично померање се, такође, може уочити у <sup>1</sup>H NMR спектру [{Pd(1,3-*pd*)Cl]<sub>2</sub>(μ-1,5-*nphe*)}(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> комплекса (Pd<sub>5</sub>). Од три мултиплета који се јављају у спектру овог комплекса, на најnižем хемијском померању (0,91 ppm) се налази сигнал H<sub>5</sub> метил протона. Преостала два мултиплета се могу приписати H<sub>2</sub> и H<sub>4</sub> метиленским протонима на 1,68 ppm и H<sub>1</sub> метиленским и H<sub>3</sub> метинским протонима на 2,83 ppm. Хемијска померања новосинтетисаних Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплекса у сагласности су са истим за структурно сличне комплексе платина(II), о којима је писано раније (61,62, 68).



Слика 15. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектри слободног 1,5-нафтиридин лиганда и комплекса {[Pd(en)Cl]<sub>2</sub>(μ-1,5-*nphe*)}(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(Pd<sub>1</sub>)



У  $^{13}\text{C}$  NMR спектру Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплекса у D<sub>2</sub>O као растварачу, појављују се четири јасна сигнала ароматичних атома угљеника у 1,5-нафитиридинском лиганду (C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub>, C<sub>4</sub> и C<sub>8</sub>, C<sub>4a</sub> и C<sub>8a</sub>, C<sub>3</sub> и C<sub>7</sub>) (67). Положаји ових сигнала се јасно разликују од истих који потичу од слободног, односно некоординованог 1,5-nphte лиганда. Ако се слободни 1,5-nphte лиганд дода у раствор комплекса у D<sub>2</sub>O растварачу повећава се интензитет ових сигнала, што представља потврду да је 1,5-nphte лиганд бидентатно координован за Pd(II) јон. Након координације N-хетероцикличног лиганда за Pd(II) сви сигнали угљеникових атома из прстенова померају се ка nižем пољу (све до +7 ppm за C<sub>2</sub> и C<sub>6</sub> атоме 1,5-nphte у Pd<sub>5</sub> комплексу, и све до +15 ppm за C атоме диаминског лиганда у Pd<sub>1</sub>). Хемијска померања сигнала угљеникових атома у одговарајућим диаминским лигандима Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплекса идентични су са истим C атомима у динуклеарним Pt(II) комплексима, {[Pt(L)Cl]<sub>2</sub>(μ-pz)}(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (61,62).

### 5.1.2 IR и UV-Vis карактеризација Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплекса

Спектри добијени употребом инфрацрвене спектроскопије за Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплексе у опсегу 4000 - 450 cm<sup>-1</sup> приказани су на слици 16.

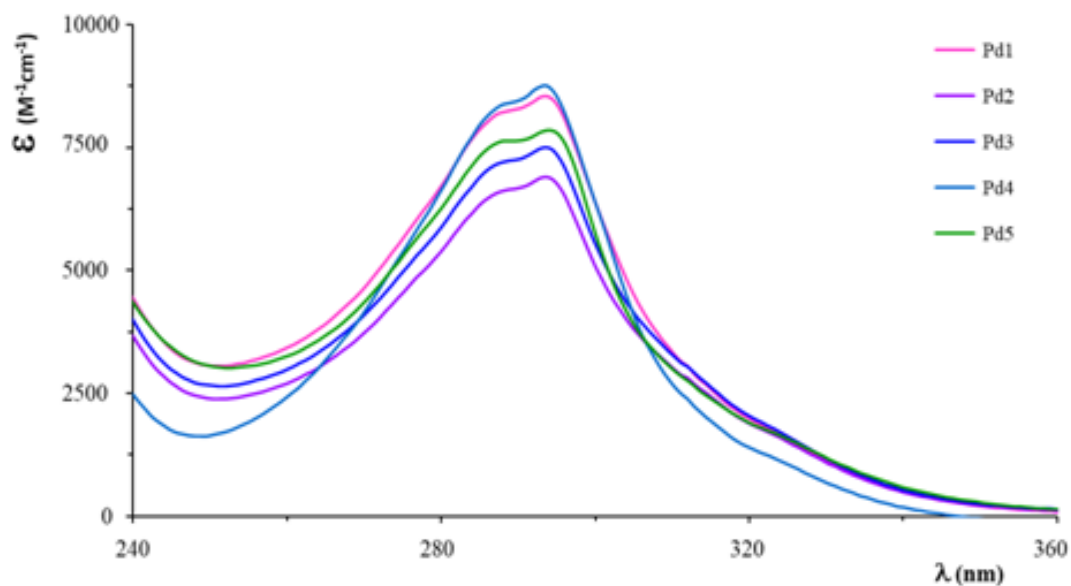
Две веома јаке и оштре траке на ~3200 и 3100 cm<sup>-1</sup> јављају се услед симетричних и асиметричних вибрација координоване амино групе диаминских лигандау комплексима Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> (67,70). Присуство апсорпционе траке на ~1300 cm<sup>-1</sup> може се приписати асиметричним вибрацијама нитратног јона у спољашњој сфери комплекса. У области 1500-1650 cm<sup>-1</sup> јавља се трака средње јачине која потиче од C=C и C=N вибрација ароматичног 1,5-нафтиридина.

Максимуми апсорпције за Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплексе добијене UV-Vis спектрофотометријом, односно њихове таласне дужине ( $\lambda_{\text{max}}$ , nm) и коефицијенти моларне екстинкције ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), наведени су у делу Резултати, док су UV-Vis спектри приказани на слици 15.

Исти начин координације 1,5-нафитиридинског лиганда у Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплексима могао би се претпоставити на основу сличног облика и сличних вредности апсорпционих ( $\lambda_{\text{max}}$ ) максимума у UV-Vis спектрима ових комплекса. Сви комплекси показују батохромно померање апсорпционих максимума услед  $\pi$ - $\pi$  интеракција у 1,5-нафтиридину након његове координације. Због преноса наелектрисања лиганд-метал (LMCT, односно „*ligand-to-metal charge transfer*”) у Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> комплексима, може се уочити апсорпциони максимум у опсегу таласне дужине ~294-296 nm.

Цитотоксички капацитет новосинтетисаних динуклеарних Pd(II) комплекса (Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub>) испитан је колориметријским МТТ тестом и то на неколико ћелијских линија: мишјем карциному дојке (4T<sub>1</sub>), мишјем карциному дебелог црева (CT<sub>26</sub>), мишјем карциному плућа (LLC<sub>1</sub>), мишјем меланому (B<sub>16</sub>F<sub>10</sub>), хуманом карциному дојке (MDA-MB<sub>468</sub>), хуманом карциному дебелог црева (HCT<sub>116</sub>) и хуманом аденокарциному плућа (A<sub>549</sub>).

Добијени резултати показали су да су сви тестирани комплекси Pd(II), у одређеним дозама, смањили одрживост ћелијских линија тумора. Међу испитиваним комплексима, Pd<sub>5</sub> је показао највећи цитотоксички капацитет према ћелијама CT<sub>26</sub>, HCT<sub>116</sub>, A<sub>549</sub> и B<sub>16</sub>F<sub>10</sub>. LLC<sub>1</sub> ћелије биле су осетљиве на ефекат Pd<sub>1</sub> комплекса, док су ћелије MDA-MB<sub>468</sub> биле посебно осетљиве на присуство Pd<sub>3</sub> комплекса. Свих пет тестираних динуклеарних Pd(II) комплекса имало је висок цитотоксични потенцијал.



Слика 16. UV-Vis спектри динуклеарних комплекса паладијума(II), Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub>.

У основи активације механизма апоптозе у организму су различити ензими из фамилије каспаза. Ови ензими су цистеин-протеиназе, које фрагментишу ћелијске протеине након аспартатних резидуа, што на крају активира нуклеазе које фрагментишу ДНК молекула током процеса апоптозе. У току ових процеса бројни други молекули протеина цитоскелета и ћелијски нуклеопротеини бивају такође разграђени (10,27). Каспазе се у ћелијама синтетишу у свом неактивном облику, а моменат њихове активације представља везивање цистеина за активно место на каспазама. Активација ензима каспаза је резултат прецизно избалансираног односа између проапоптотских и антиапоптотских молекулских путева. Данас се зна да постоје два могућа пута апоптозе, која даље воде ка активацији ензима каспазе, а то су унутрашњи (митохондријски) пут и спољашњи пут активације, односно пут рецептора смрти. Дакле, разлика између наведена два пута се односи на начин активације ензима из фамилије каспаза, али се након активације оба пута сусрећу на нивоу извршних каспаза, које ће даље иницирати бројне биолошке процесе. Крајњи исход је неминовна и неопозива смрт ћелије. Повезано са тим, каспазе од значаја за апоптотски процес се могу класификовати на иницијалне каспазе и ефекторске каспазе (27,28). У иницијалне каспазе спадају каспазе тип 2, 8, 9 и 10, док се у ефекторске каспазе сврставају каспазе тип 3, 6 и 7. Уопштено гледано, каспазе се у организму налазе у свом неактивном облику (у облику прокаспаза), и то као мономерне јединице са инактивним доменима. До превођења неактивног у активни облик, односно превођења прокаспаза у каспазе, долази захваљујући димеризацији која се одвија везивањем адаптерних протеина за продомене на проензимима каспаза. Такође, поред каспаза, у апоптотском процесу су значајни протеини Bcl-2 који, у ствари, представљају унутарћелијске регулаторе апоптозе. Ова група протеина се, даље, класификује на проапоптотску групу, која стимулише процес апоптозе (Bax, Bak, Bad, Bim, Bik, Bid, Bcl, Bcl-Xs итд.) и антиапоптотску групу, која инхибира апоптотски процес (нпр. Bcl-W, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 и сл.) (27-30). Унутрашњи (митохондријски) пут активације апоптозе је на нивоу организма одговоран за апоптозу у највећем броју случајева и регулисан је са више од 20 различитих протеина, међу којима је, свакако, назначајнији Bcl-2 протеин. Наиме, у стањима када је ћелија изложена дејству фактора

који оштећују ДНК или се у ћелији акумулира абнормална количина мутираних протеина, долази до повећане пропустљивости на спољашњој мембрани митохондрија, првенствено дејством проапоптоских протеина Вах и Вак. Наведени проапоптотски протеини подлежу димеризацији, уграђују се у митохондријалну мембрану и формирају канале кроз које ће цитохром Ц и други митохондријални протеини изаћи из унутрашњости митохондрије у ћелијски цитосол. Ослобођени цитохром Ц и други протеини митохондрија сада у цитосолу активирају ензим каспазу тип 9, а неки протеини истовремено блокирају и активност антагониста каспаза, који представљају биолошке инхибиторе процеса апоптозе. Као крајњи резултат овог процеса, долази до активације каспазне каскадне реакције, која на крају доводи до фрагментисања свих структура, па и једра ћелије. Супротно наведеном, уколико је ћелија изложена сигнаlima за преживљавање или факторима раста, синтетисаће се антиапоптотски протеини из групе Bcl-2 који антагонизују ефекте протеина Вах и Вак, чиме се ограничава излазак цитохрома Ц и других проапоптотских протеина из митохондрије (10, 31-34). Спољашњи пут активације апоптозе (пут рецептора смрти) је одговоран, између осталог, и за уклањање аутореактивних лимфоцита, те уништавање „таргет“ ћелија од стране појединих цитотоксичних Т-лимфоцита, као и остарелих и туморских ћелија. Овај пут активације апоптозе се одвија преко тзв. рецептора смрти који припадају фамилији TNF рецептора, међу којима су значајнији рецептор за тип I TNF и Fas-лиганд (CD95). Fas-лиганд се експримује на активираним Т-лимфоцитима и активира ензим каспазу тип 8 и 10, што последично даље води ка каскадној реакцији активације каспазе. Наиме, активирање иницијалних каспаза (тип 8 и 10) утиче на даљу активацију каспаза тип 3 и 7, односно ефекторских каспаза. Оно што је значајно нагласити јесте да ензим каспаза тип 8 може да изврши активацију Bid-а (проапоптотски члан из фамилије Bcl протеина), те тиме ћелију уводи и у унутрашњи (митохондријски) пут активације апоптозе. Ова комбинација спољашњег пута активације апоптозе и митохондријског пута активације апоптозе је апсолутно смртоносна за ћелију. Такође, ћелијски протеин који је најзначајнији антагонист каспаза, јер блокира њихову активност на путу нисходног преношења сигнала од рецептора смрти, је FLIP протеин, чије хомологе производе поједини вируси, па се сматра да то може бити један од потенцијалних механизма на основу којег вируси успевају да опстану у животу унутар инфициране ћелије (10,30,35-38).

Развој антитуморских лекова на бази јона метала је започет пре више од пола века, случајним открићем антитуморских ефеката цисплатине (46). Цисплатина ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) који је хемијски означена као *cis*-диаминдихлорплатина(II) је једињење платина(II) јона, које је на собној температури постојано као жути прах, слабо растворљиво у води (47). Данас се једињење цисплатина користе у третирању различитих карцинома, а нарочито карцинома у регији главе и врата, карцинома јајника, карцинома тестиса, карцинома плућа и карцинома мокраћне бешике (49). Његово цитотоксично дејство је у највећој мери резултат формирања унутарланчаних ковалентних адуката са молекулом ДНК, и то између суседних база гуанина, чиме је заустављена репликација и/или транскрипција ДНК молекула (49). Међутим, примена овог комплекса платине(II) је ограничена, због бројних нежељених ефеката. *Dasari* и *Tchoinwou* указују да примена комплекса платине(II) у третирању карцинома, поред нежељених ефеката међу којима су најчешћи инсуфицијенција бубрега, алергијске реакције, повећана осетљивост организма на инфекције, гастроинтестинални поремећаји, крварења, губитак слуха, као и резистенција тумора на овај лек (49). Наиме, они сматрају да се превазилажење резистенције тумора и смањење токсичности комплекса платине(II) може постићи комбиновањем комплекса платине(II) са другим лекова (49).

Све претходно наведено је значајно детаљно описати, јер истраживања указују на значај оба механизма активације апоптозе на потенцијалне бенефите у лечењу карцинома (71-78).

Бројна истраживања указују на значај апоптозе у третирању карцинома (71-75). У свом истраживању, *Wong* и сарадници истичу да је изостанак апоптозе или смањен број процеса апоптозе суштински разлог преживљавања, те последичног умножавања малигних ћелија (71). У вези с тим, *Letai* и сараднициу својој студији истичу да је неопходно уложити веће напоре у будућности који ће бити усмерени ка комбинацији различитих агенаса који врше селективну индукцију апоптозе у ћелијама карцинома, како би се унапредио процес лечења (73).

Примарни синтетисани комплекси паладијума(II) представљали су структурне аналоге комплекса платине(II) и то *cis*-[PdCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] и *cis*-[PdCl<sub>2</sub>(dach)] једињења (53,54). Међутим, поменути комплекси паладијума(II) су показали слабији антитуморски ефекат у односу на одговарајуће комплексе платине(II), те је правилан избор лиганда пресудан за модификацију реактивности, липофилности стабилности самог комплекса. Због наведеног, временом су синтетисани бројни комплекси паладијума са лигандима попут путресцина, спермина, лиганда еддатипа и деривата куркукима (55,56), а који имају антитуморски ефекат који је приближно једнак или чак бољи од цисплатине. Испитивања усмерена на механизам деловања комплекса паладијума(II) на ДНК молекула показала су да неки од комплекса паладијума(II) реагују са олигонуклеотидним комплексом [d(CGCGAATTCGG)<sub>2</sub>], при чему долази до везивања Т<sub>8</sub>, имино, G<sub>4</sub> и N<sub>7</sub> атома. Наиме, монофункционални комплекси се селективно везују са G<sub>2</sub> и G<sub>10</sub> базама, бифункционални комплекси показују селективно везивање за N<sub>7</sub>, док [Pd(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]<sub>2+</sub> више утиче на G<sub>2</sub> и G<sub>4</sub> базе (71). Прегледни рад из 2020. године, написан од стране *Carneiro* и сарадника, указује да је, иако се већина до тада реализованих студија бавила монунуклеарним комплексима паладијума(II), све веће интересовање научних кругова за бидентатне комплексе, као и за полинуклеарне структуре паладијума(II). Штавише, *in vitro* испитивања на појединим ћелијским линијама карцинома указују на додатну потребу за испитивањем оваквих комплекса, не само на ћелијским линијама карцинома, већ и на здравим ћелијским популацијама, како би се испитао и њихов ефекат на метаболичке процесе у организму који изазивају нежељене ефекте (80). *Voixassa* и сарадници су у свом истраживању из 2003. године приказали нови динуклеарни комплекс паладијума(II) [Pd(μ-pz)(pzH)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, те његову синтезу и кристалну карактеризацију (81). Аутори наводе да је новосинтетисано једињење први динуклеарни хомолептички комплекс паладијум(II) пиразолата (81). Овај динуклеарни пиразолатом премошћени паладијум(II) комплекс добијен је интеракцијом пиразола, натријум-етоксида и [Pd(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>](BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, а у основној структури новосинтетисаног комплекса паладијума(II) јона два атома паладијума су премошћена са два пиразолатна лиганда, која употпуњују квадрантно-планарну структуру сваког од паладијумских атома (81).

У нашем истраживању се након синтетисања динуклеарних паладијум(II) комплекса приступило *in vitro* анализирању цитотоксичних ефеката и поређењу тих ефеката са ефектима цисплатине као контролног цитостатика. Добијени резултати показали су да су сви тестирани комплекси паладијума(II) у одређеним дозама смањили одрживост ћелијских линија тумора. Такође, уочено је да иако комплекси паладијума(II) показују мању цитотоксичност на различитим туморским ћелијским линијама него референтни лек на бази јона метала, они ипак имају већу селективност према мезенхимским матичним ћелијама, односно мање су токсични према њима. Сличан механизам многих једињења у поступку усмереном против карцинома је индукција изумирања туморских ћелија, преко процеса апоптозе. Наиме, у претходно спроведеним

студијама је установљено да неки динуклеарни паладијум(II) комплекси индукују апоптозу одређених ћелијских линија карцинома (64-66). У прилог овоме говори и студија *Fiuza* и сарадника који су поредили ефекте динуклеарног Pd(II) комплекса Pd<sub>2</sub>-Spm са цисплатином на специфичним ћелијским линијама карцинома дојке (ћелијска популација MCF<sub>7</sub> и ћелијска популација MDA-MB<sub>231</sub>), као и на здравој нетрансформисаној ћелијској линији (82). Резултати добијени у наведеној студији, показали су да Pd<sub>2</sub>-Spm и цисплатина имају добри антипролиферативни потенцијал, с тим да је Pd<sub>2</sub>-Spm ефикаснији против MCF<sub>7</sub> ћелијске линије (82).

Недавна студија показала је да динуклеарни Pt(II) комплекси са 1,5-нафтиридином као мостним лигандом изазвају апоптотично изумирање ћелија CT<sub>26</sub> (60). Како би се одредио механизам деловања динуклеарних комплекса паладијума(II), анализирали смо ћелије 4T<sub>1</sub> након двадесетчетворочасовног третмана коришћењем анексин 5 и пропиридијум-јодида двоструким бојењем. Комплекс Pd<sub>5</sub> коришћен је као представник лека за овај експеримент због његовог сличног цитотоксичног капацитета према ћелијама 4T<sub>1</sub>, као и према цисплатини (IC<sub>50</sub> 24,12μM) и највишег степена цитотоксичне селективности. Изгледа да је Pd<sub>5</sub> комплекс окидач и за апоптотску и за некротску ћелијску смрт.

Цитотоксични ефекат различитих динуклеарних Pd(II) комплекса био је предмет бројних студија спроведених широм света (64,69,83-85). Истраживање групе аутора из Ирана спроведено 2014. године бавило се испитивањем могућих цитотоксичних ефеката три новосинтетисана Pd(II) комплекса са диетилдитиокарбаматом, насталих у интеракцији између [Pd(phen)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] и динатријумових соли алкиленбисдитиокарбамата (*al-bis-dtc*), на одређене ћелијске линије карцинома желуца (AGS), сквамозног карцинома једњака (Kyse-30) и хепатоцелуларног карцинома јетре (HepG<sub>2</sub>) (83). Наведена студија је показала да су новосинтетисани комплекси паладијума(II) у потпуности имали смртоносан ефекат на туморске ћелије, са статистички значајном мањом вредношћу полумаксималне инхибиторне концентрације (енгл. *Half Maximal Inhibitory Concentration*, IC<sub>50</sub>) у односу на цисплатину (83). Аутори поменутог истраживања у закључку указују на могућност да новосинтетисани комплекси паладијума(II) могу представљати нову класу хемиотерапеутских једињења која ће се користити у терапији против предходно споменутих карцинома (83). Слично томе, група аутора из Шпаније је показала да шест новосинтетисаних квадрантно-планарних комплекса паладијума(II) са тиазинским и тиазолинским лигандима има умерен цитотоксични ефекат на три различите ћелијске линије (HeLa ћелијска линија епителног карцинома грлића материце, HL<sub>60</sub> ћелијска линија промијелоцитне леукемије и U<sub>937</sub> ћелијска линија хистиоцитног лимфома) (84). Штавише, новосинтетисани квадрантно-планарни паладијум(II) комплекси са тиазинским и тиазолинским лигандима су имали ниске вредности IC<sub>50</sub>, које су се кретале у распону од 46,39 ± 3,99 μM до 62,74 ± 6,45 μM, од којих су чак два новосинтетисана паладијум(II) комплекса са фенилским прстеновима у својој структури довела до повећања апоптотске активности ћелија (84). Још једно интересантно истраживање је студија синтезе, као и испитивања структуралних, физичко-хемијских и биолошких својстава два комплекса паладијума(II) са 2,6-диметил-4-нитропиридином (dmnp), спроведено у Пољској (84). Поменути новосинтетисани комплекси паладијум(II) су монунуклеарни комплекс [Pd(dmnp)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] и динуклеарни комплекс [Pd<sub>2</sub>(dmnp)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>] (85). Прелиминарне процене антитуморских (антипролиферативних) карактеристика два новосинтетисана комплекса паладијум(II) и пратећег лиганда процењивања су у *in vitro* условима на четири различите туморске ћелијске линије, и то на: 1) SW<sub>707</sub> ћелијској линији ректалног карцинома; 2) T<sub>47D</sub> ћелијској линији карцинома дојке; 3) HCV ћелијској линији карцинома мокраћне

бешике; и 4) A<sub>549</sub> ћелијској линији микроцелуларног карцинома плућа (85). Резултати добијени на основу ових испитивања показали су високу цитотоксичну активност мононуклеарног комплекса паладијума(II) [Pd(dmp)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] према свим одабраним туморским ћелијским линијама, док је цитотоксична активност динуклеарног комплекса паладијума(II) и слободног лиганда била умерена (85).

Када је реч о истраживањима у Републици Србији, Тоћић и сарадници су се у својој студији објављеној 2017. године бавили процесом синтезе и испитивањем цитотоксичне активности новосинтетисаних динуклеарних паладијум(II) комплекса (69). Наиме, они су синтетисали окарактерисали шест нових динуклеарних комплекса паладијума(II) [ $\{Pd(2,2'\text{-bipy})Cl\}_2(\mu\text{-pz})\}(ClO_4)_2$  (Pd1), [ $\{Pd(dach)Cl\}_2(\mu\text{-pz})\}(ClO_4)_2$  (Pd2), [ $\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-pz})\}(ClO_4)_2$  (Pd3), [ $\{Pd(2,2'\text{-bipy})Cl\}_2(\mu\text{-4,4'\text{-bipy}})\}(ClO_4)_2$  (Pd4), [ $\{Pd(dach)Cl\}_2(\mu\text{-4,4'\text{-bipy}})\}(ClO_4)_2$  (Pd5) и [ $\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-4,4'\text{-bipy}})\}(ClO_4)_2$  (Pd6) (2,2'-bipy=2,2'-бипиридил, pz =пиразин, dach =*trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан, en =етилендиамин и 4,4'-bipy =4,4'-бипиридин) (69). Високе вредности константи везивања за говеђи албумински протеин новосинтетисаних динуклеарних комплекса паладијума(II) у овом истраживању указују на добар афинитет везивања. Такође, сви комплекси су показали цитотоксичну активност према ћелијској линији хуманог епителног карцинома грлића материце HeLa и ћелијској линији хуманог епителног карцинома дојке MDA-MB<sub>231</sub>, која се кретала у распону од умерене до високе (69). Умерена до висока цитотоксична активност се изгледа огледа у високој апоптотској активности новосинтетисаних динуклеарних комплекса паладијума(II) према малигним ћелијама, уз значајно мању осетљивост здравих фибробласта према новосинтетисаним динуклеарним комплексима паладијума(II) (69). Штавише, три од шест новосинтетисаних динуклеарних комплекса паладијума(II), и то Pd<sub>4</sub>, Pd<sub>5</sub> и Pd<sub>6</sub> показала су изражен ефекат на хуманим фибробластима плућне ћелијске линије MDA-MB<sub>231</sub> у фази G<sub>1</sub>/S ћелијског циклуса (69). Слично истраживању Тоћића и сарадника, Франић и сарадници су се бавили испитивањем карактеристика три новосинтетисана динуклеарна комплекса паладијума(II), [ $\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-L})\}(NO_3)_2$  [L је мостни лиганд киноксалин (Pd<sub>1</sub>), хиназолин (Pd<sub>2</sub>) и фталазин (Pd<sub>3</sub>)] (64). Наиме, интеракција поменутих новосинтетисаних динуклеарних комплекса паладијума(II) са ДНК молекулом говеђега тимуса је праћена и мерењима вискозитета, док су у *in vitro* условима аутори тестирали антипролиферативне и апоптотске активности поменутих новосинтетисаних паладијум(II) динуклеарних комплекса на ћелијским популацијама карцинома плућа и карцинома колоректалне регије (64). Резултати истраживања су показали да тестирани новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II) имају значајно мању цитотоксичну ефективност од цисплатине на примењеним ћелијским линијама колоректалног карцинома, те да имају сличну или чак већу цитотоксичност од цисплатине према одабраним ћелијским линијама карцинома плућа (64). Сви новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II) су индуковали апоптозу туморских ћелија колоректалног карцинома и карцинома плућа, док је највећи антипролиферативни ефекат показао један од три новосинтетисана динуклеарна комплекса, конкретно Pd<sub>2</sub> комплекс (64).

Представљени подаци и добијени резултати показали су потенцијал динуклеарних комплекса паладијума(II) у антитуморској терапији, тако да захтевају даље проучавање у овој области.

## **6. ЗАКЉУЦИ**

1. Пет динуклеарних  $[\{Pd(L)Cl\}^2(\mu-1,5-nphe)](NO_3)_2$  комплекса Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> (L је етиленедиамин, 1,2-пропиленедиамин, 1,2-диаминоциклохексан, 1,3-пропилендиамин, 1,3-пентанедиамин, док је 1,5-nphe мостни лиганд 1,5-нафтиридин) добијени су и окарактерисани помоћу елементалне микроанализе и различитим спектроскопским методама. Комплекси Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> имају формиран петочлани прстен са хелатним диаминским лигандима, док у комплексима Pd<sub>4</sub> и Pd<sub>5</sub> бидентатни лиганди након координације формирају шесточлани прстен. Мононуклеарне Pd(II) јединице  $[Pd(L)Cl]^+$  су квадратно-планиране геометрије, али се разликују у конформацији диаминских прстенова. У Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>3</sub> диамински прстенови имају уобичајену конформацију увијања. Шесточлани хелатни прстен у комплексима Pd<sub>4</sub> и Pd<sub>5</sub> је у формацији столице, на основу раније добијених резултата рендгенско структурне анализе кристалног облика комплекса Pt(II) и Pd(II) са различитим диаминским лигандима.
2. Из наведених чињеница може се претпоставити да различите конформације три петочлана и два шесточлана прстена у комплексима Pd<sub>1</sub>-Pd<sub>5</sub> значајно утичу на антитуморску активност ових комплекса.
3. Цитотоксична активност комплекса тестирана је на неколико ћелијских линија мишићег и људског карцинома. Сви тестирани Pd(II) комплекси су смањили одрживост ћелијских линија тумора у односу на дату дозу. Највиши цитотоксични капацитет према CT<sub>26</sub>, HTС<sub>116</sub>, A<sub>549</sub> и В<sub>16</sub>F<sub>10</sub> ћелијама показао је комплекс Pd<sub>5</sub>. Иако су Pd(II) комплекси били неколико пута мање цитотоксични у поређењу са цисплатином, они поседују већу селективност према мезенхијским матичним ћелијама, нарочито комплекс Pd<sub>5</sub>.
4. Могући механизам цитотоксичне активности Pd<sub>5</sub> комплекса је повећавање апоптозе смањивањем антиапоптозног Bcl-2 и повећањем проапоптозног типа каспазе - каспазе тип 3.
5. Добијени резултати су показали потенцијал динуклеарних комплекса паладијума(II) у антитуморској терапији и захтевају даље проучавање.



## 7. Литература

1. World Health Organization. Cancer - Fact sheets. 03 march 2021 (доступно на: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>).
2. Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“. Здравствени показатељи у Републици Србији – систем презентације података (доступно на: [https://www.batut.org.rs/download/zdravstveni\\_pokazatelji\\_rs\\_2020.html](https://www.batut.org.rs/download/zdravstveni_pokazatelji_rs_2020.html)).
3. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. The Global Cancer Observatory: Colorectal cancer 2020 (доступно на: [https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10\\_8\\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf](https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf)).
4. Mahmoud N.N. Colorectal cancer: Preoperative evaluation and staging – Review article. *Surgical Oncology Clinics* 2022; 31(2): 121-141.
5. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz K.E. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers (Basel)* 2021;13(9):2025.
6. Granados-Romero J.J, Valderrama-Treviño A.I, Contreras-Flores E.H, Barrera-Mera B, Enríquez MH, Uriarte-Ruíz K, et al. Colorectal cancer: A review. *Int J Res Med Sci* 2017; 5:4667-4676.
7. Kirkegaard H, Johnsen N.F, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: A prospective Danish cohort study. *BMJ*. 2010;341:c5504.
8. Nicola S.F et al. Genetics of colorectal cancer: Hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin* 2002; 64(1):27–43.
9. Nguyen L.H, Goel A, Chung D.C. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020; 158(2):291-302.
10. Kumar V, Abbas A.K, Aster J.C. Robbins and Conran Pathologic Basis of Disease - 9th Edition. Elsevier, Philadelphia, 2015.
11. Akkoca A.N, Yanık S, Ozdemir Z.T, Cihan F.G, Sayar S, Cincin T.G, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2828-2835.
12. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):359-386.
13. Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“. Инциденција и морталитет рада у Централној Србији 999-2008; 2010. (доступно на: <http://www.batut.org.rs/>).
14. Brambilla E, et al. The new World Health Organization classification of lung tumors. *Eur Respir J* 2001;18:1059.
15. Brambilla E. Basaloid carcinoma of the lung. In Corrin B, ed. *Pathology of Lung Tumors*. New York: Churchill Livingstone, 1997:71.
16. Muhammed A, Mehwish I, Muhammed D, Asmat Ullah K. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research* 2017; 2:50(1):33.
17. World Health Organization. Breast cancer: Fact sheets. 2021 (доступно на: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>)

18. Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“. Истраживање здравља становништва Србије – 2019. година. Београд, 2021. година (доступно на: chrome- <https://publikacije.stat.gov.rs/G2021/pdf/G20216003.pdf>)
19. Sun Y.S, Zhao Z, Yang Z.N, Xu F, Lu H.J, Zhu Z.Y, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017;13(11):1387-1397.
20. Tavassoli F.A, Devilee P. World health organisation classification of tumors. Tumors of the breast and female genital organs. France: IARC Press; 2003.
21. Hayes D.F, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: Current and New Predictors of Metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6:375–392.
22. Edge B, Byrd R, Compton C. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer; 2010.
23. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals – A review. *Braz. J. Biol.* 2021; 81(4):1133-1143
24. Kroemer G, Piacentini M. Dying to survive - apoptosis, necroptosis, autophagy as supreme experiments of nature. *Int J Dev Biol* 2015; 59(1-3):5-9.
25. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
26. D’Arcy M.S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* 2019; 43(6):582-589.
27. McIlwain D.R, Berger T, Mak T.W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(4):a008656.
28. Hussar P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia* 2022, 2:1624-1636.
29. De Vasconcelos N.M, Van Opdenbosch N, Gorp H.V, Martín-Pérez R, Zecchin A, Vandenabeele P, Lamkanfi M. An Apoptotic Caspase Network Safeguards Cell Death Induction in Pyroptotic Macrophages. *Cell Reports* 2020; 32(4):107959.
30. Hyman B, Yuan J. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13:395–406.
31. Jan R, Chaudhry G.E. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019; 9(2):205-218.
32. Wang C, Youle R.J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009; 43:95-118.
33. Lopez J, Tait S. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 2015; 112:957-962.
34. Green D.R. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis: Part I: MOMP and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(5):a041038.
35. Yanumula A, Cusick J.K. Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. [Updated 2022 Aug 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan- (available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560811/>).
36. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998; 254(3):439-459.
37. Guicciardi M.E, Gores G.J. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009; 23(6):1625-1637.
38. Peterson K, Palmer B, Christensen C, Bailey S, Mizrachi D. Constitutively Active Death Receptor Induces Apoptosis in Mammalian Cells. *Arch Mol Biol Genet.* 2022; 1(1):20-28.
39. Sadowski-Debbing K, Coy J.F, Mier W, Hug H, Los M. Caspases-their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2002; 50(1):19-34.
40. Kumar, S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007; 14:32–43.

41. Porter A, Jänicke R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6:99–104.
42. Yigong S. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell* 2002; 9(3):459-470.
43. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004; 13(8):1979-1987.
44. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara R.L, et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 2013; 14:32.
45. Brown K, Awan N.A, Le P.H, et al. Histology, Cell Death. [Updated 2023 Jan 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 (available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526045/>).
46. Rancoule C, Guy J.B, Vallard A, Ben M. M, Rehalia A, Magné N. Les 50 ans du cisplatine [50th anniversary of cisplatin]. *Bull Cancer.* 2017; 104(2):167-176.
47. Hazardous Substances Data Bank (HSDB) (доступно на: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~LDI35z:>).
48. Rosenberg B, VanCamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965; 205:698-699.
49. Dasari S, Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740:364-378.
50. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res.* 2016; 106:27-36.
51. Cotton F.A, Wilkinson G. Advanced inorganic chemistry. John Wiley & Sons Inc., New York, 1972.
52. Janković V. Hemijski elementi. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd, 2012.
53. Butour J.L, Wimmer S, Wimmer F, Castan P. Palladium (II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: a comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA in vitro. *Chem Biol Interact.* 1997; 104:165-178.
54. Zhao G, Lin H, Yu P, Sun H, Zhu S, Su X, et al. Ethylenediamine palladium(II) complexes with pyridine and its derivatives: synthesis, molecular structure and initial antitumor studies. *J Inorg Biochem.* 1999; 73:145-149.
55. Vujić J.M, Cvijović M, Kaluderović G.N, Milovanović M, Zmejkovski B.B, Volarević V, Arsenijević N, Sabo T.J, Trifunović S.R. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(9):3601-3606.
56. Ilić D.R, Jevtić V.V, Radić G.P, Arsikin K, Ristić B, Harhaji-Trajković L, Vuković N, Sukdolak S, Klisurić O, Trajković V, Trifunović S.R. Synthesis, characterization and cytotoxicity of a new palladium(II) complex with a coumarine-derived ligand. *Eur J Med Chem.* 2014; 74:502-508.
57. Gao E, Lin L, Liu L, Zhu M, Wang B, Gao X. Two new palladium (II) complexes: synthesis, characterization and their interaction with HeLa cells. *Dalton Trans.* 2012; 41(36):11187-11194.
58. Sayar H, Bashardoust P. Therapies for acute myeloid leukemia: vosaroxin. *Onco Targets Ther.* 2017; 10:3957-3963.
59. Margiotta N, Savino S, Gandin V, Mrzano C, Natile G. Monofunctional Platinum(II) Complexes with Potent Tumor Cell Growth Inhibitory Activity: The Effect of a Hydrogen-Bond Donor/Acceptor N-Heterocyclic Ligand. *ChemMedChem* 2014; 9:1161-1168.

60. Konovalov B, Živković M.D, Milovanović J.Z, Đorđević D.B, Arsenijević A.N, Vasić I.R, Janjić G.V, Franich A, Manojlović D, Skrivanj S, Milovanović M.Z, Đuran M.I, Rajković S. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum(II) complexes with an aromatic 1,5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum(II) complexes in relation to the complex structure. *Dalton Trans.* 2018; 47(42):15091-15102.
61. Rajković S, Ašanin D.P, Živković M.D, Đuran M.I. Synthesis of different pyrazine-bridged platinum(II) complexes and H-1 NMR study of their catalytic abilities in the hydrolysis of the N-acetylated L-methionylglycine. *Polyhedron* 2013; 65:42-47.
62. Rajković S, Živković M, Waržajtis B, Rychlewska U, Đuran M. Synthesis, spectroscopic and X-ray characterization of various pyrazine-bridged platinum(II) complexes: <sup>1</sup>H NMR comparative study of their catalytic abilities in the hydrolysis of methionine- and histidine-containing dipeptides. *Polyhedron* 2016; 117:367-376.
63. Peña-Morán O.A, Villarreal M.L, Álvarez-Berber L, Meneses-Acosta A, Rodríguez-López V. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. *Molecules.* 2016; 21(8):1013.
64. Franić A.A, Živković M.D, Čočić 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.
65. Gao E.J, Ma X.Y, Wang B. et al. A novel dinuclear Pd(II) complex dibridged by 2,2-iminodibenzoic acid: Synthesis, characterization, and biological activity. *Russ J Coord Chem* 2016; 42:749–754.
66. Qin Q.P, Zou B.Q, Tan M.X, Luo D.M, Wang Z.F, Wang S.L, Liu Y.C.. High in vitro anticancer activity of a dinuclear palladium(II) complex with a 2-phenylpyridine ligand. *Inorganic Chemistry Communications* 2018; 96:106-110.
67. Bošković M, Franich A.A, Rajković S, Jovanović M, Jurisević M, Gajović N, Jovanović M, Arsenijević N, Jovanović I, Živković M.D. Potential Antitumor Effect of Newly Synthesized Dinuclear 1,5-Naphthyridine-Bridging Palladium(II) Complexes. *ChemistrySelect* 2020; 5:10549–10555.
68. Ašanin D.P, Živković M.D, Waržajtis B, Rychlewska U, Đuran M.I. Crystallographic evidence of anion... π interactions in the pyrazine bridged {[Pt(en)Cl] 2 (μ-pz)} Cl<sub>2</sub> complex and a comparative study of the catalytic ability of mononuclear and binuclear platinum (II) complexes in the hydrolysis of N-acetylated l-methionylglycine. *Polyhedron* 2013; 51:255-262.
69. Čočić D.S, Jovanović S, Nišavić M, Baskić D, Todorović D, Popović S, Bugarčić ŽD, Petrović B. New dinuclear palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem.* 2017; 175:67-79.
70. Chattopadhyay S, Chakraborty P, Drew M.G.B, Ghosh A. Nickel(II) Complexes of Terdentate or Symmetrical Tetridentate Schiff Bases: Evidence of the Influence of the Counter Anions in the Hydrolysis of the Imine Bond in Schiff Base Complexes. *Inorganica Chimica Acta* 2009; 362:502-508.
71. Wong R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1):87.
72. Carneiro B.A, El-Deiry W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020; 17:395–417.
73. Letai A. Apoptosis and cancer. *Annual Review of Cancer Biology* 2017; 1:275-294.

74. Morana O, Wood W, Gregory C.D. The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23:1328.
75. Singh P, Lim B. Targeting Apoptosis in Cancer. *Curr Oncol Rep* 2020; 24:273–284.
76. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. *J Clin Invest.* 2015; 125:487-489.
77. Fitzgerald M.C, O'Halloran P.J, Connolly N.M.C. et al. Targeting the apoptosis pathway to treat tumours of the paediatric nervous system. *Cell Death Dis* 2022; 13:460.
78. Westaby D, Jimenez-Vacas J.M, Padilha A, Varkaris A, Balk S.P, de Bono J.S, Sharp A. Targeting the Intrinsic Apoptosis Pathway: A Window of Opportunity for Prostate Cancer. *Cancers* 2022; 14:51.
79. Ćoćić D.S, Jovanović S.M, Bugarčić Ž.D, Petrović B.V. Ispitivanje interakcije kompleksa platine(II) i paladijuma(II) sa DNK i BSA. Četvrta koferencija mladih hemičara Srbije - Beograd, 2016. Knjiga sažetaka - BB P13 (strana 76).
80. Carneiro T.J, Martins A.S Marques M.P.M, Gil A.M. Metabolic aspects of palladium(II) potential anti-cancer drugs. *Frontiers in Oncology* 2020; 10:590970.
81. Boixassa A, Pons J, Solans X, Font-Bardia M, Ros J. New dinuclear Pd(II) complex with pyrazolate bridges. Synthesis and crystal structure of  $[\text{Pd}(\mu\text{-pz})(\text{pzH})_2]_2(\text{BF}_4)_2$  (pzH=pyrazole). *Inorganic Chemistry Communications* 2003; 6(7):992-925.
82. Fiuza S.M, Holy J, Batista de Carvalho L.A, Marques M.P. Biologic activity of a dinuclear Pd(II)-spermine complex toward human breast cancer. *Chem Biol Drug Des.* 2011;77(6):477-488.
83. Hadizadeh S, Najafzadeh N, Mazani M, Amani M, Mansouri-Torshizi H, Niapour A. Cytotoxic Effects of Newly Synthesized Palladium(II) Complexes of Diethyldithiocarbamate on Gastrointestinal Cancer Cell Lines. *Biochem Rest Int.* 2014; 2014:813457.
84. Fernández-Delgado E, Estirado S, Rodríguez A.B, Luna-Giles F, Viñuelas-Zahinos E, Espino J, Pariente J.A. Cytotoxic Effects of New Palladium(II) Complexes with Thiazine or Thiazoline Derivative Ligands in Tumor Cell Lines. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):696.
85. Kuduk-Jaworska J, Puszko A, Kubiak M, Pełczyńska M. Synthesis, structural, physico-chemical and biological properties of new palladium(II) complexes with 2,6-dimethyl-4-nitropyridine. *J Inorg Biochem.* 2004; 98(8):1447-1156.

## Биографија аутора

Др Миладин Бошковић рођен је 06.02.1975. године у Сјеници. Република Србија. Основну школу и средњу школу - гимназију (природно-математички смер) завршио је у Сјеници. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу је уписао школске 1993/1994. године, а дипломирао 2001. године на студијском програму интегрисане академске студије медицине, са просечном оценом 8,40. Школске 1994/1995. године обављао је дужност студента демонстратора на предмету Анатомија. Школске 2005/2006. године уписао је докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, на изборном подручју Клиничка и експериментална хирургија, а 2021. године је положио усмени докторски испит, са просечном оценом 9,00. Специјалистички испит из опште хирургије положио је 2015. године. Аутор је и коаутор укупно 3 научна рада објављена у домаћим и међународним часописима, од којих је један из области докторске дисертације. Познаје рад на рачунару (*Word, Excel, Power Point, SPSS*) и говори два страна језика - енглески и француски.

Образац 1

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

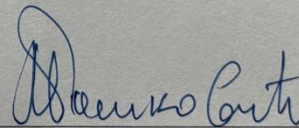
**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНИ АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКТИ  
1,5-НАФТИРИДИНСКИХ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II)**

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, 19.01.2024. године,



потпис аутора



Образац 2

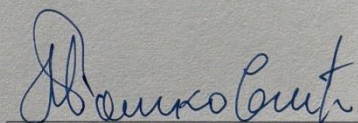
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНИ АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКТИ  
1,5-НАФТИРИДИНСКИХ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II)**

истоветне.

У Крагујевцу, 19.01.2024. године,

  
потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Миладин Бошковић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНИ АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКТИ**

**1,5-НАФТИРИДИНСКИХ ДИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II)**

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

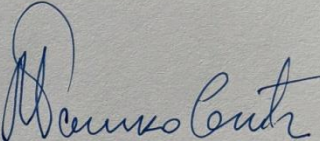
не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 прерада<sup>2</sup>**

У Крагујевцу, 19.01.2024. године,



\_\_\_\_\_

потпис аутора

---

<sup>2</sup> 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/>