



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Миона Д. Глишић

**ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ
НОВОСИНТЕТИСАНИХ КОМПЛЕКСА
ПАЛАДИЈУМА(II) НА ЋЕЛИЈЕ
СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА
УСНЕ ДУПЉЕ *IN VITRO***

докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Miona D. Glišić

**ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI
NOVOSINTETISANIH KOMPLEKSA
PALADIJUMA(II) NA ĆELIJE
SKVAMOCELULARNOG KARCINOMA
USNE DUPLJE *IN VITRO***

doktorska disertacija

Kragujevac, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Miona D. Glišić

**THE CYTOTOXICITY OF NEWLY
SYNTHESIZED PALLADIUM(II)
COMPLEXES ON SQUAMOUS CELL
CARCINOMA CELLS IN VITRO**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Идентификациона страница докторске дисертације (ћирилицом)

| Аутор |
|--|
| Име и презиме: Миона Глишић |
| Датум и место рођења: 27.06.1993. године, Крагујевац |
| Садашње запослење: Завод за денталну медицину, Крагујевац |
| Докторска дисертација |
| Наслов: ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) НА ЋЕЛИЈЕ СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА УСНЕ ДУПЉЕ <i>IN VITRO</i> |
| Број страница: 91 |
| Број слика: 9 графикана, 7 слика и 2 табеле |
| Број библиографских података: 255 |
| Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац |
| Научна област (УДК): Медицина |
| Ментор: титула, име и презиме, звање, назив факултета/института и универзитета |
| проф. др Милан Зарић, ванредни професор за ужу научну област Медицинска биохемија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу |
| Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: |
| Одлука број IV-03-681/36 од 14.09.2023. године |

Identifikaciona stranica doktorske disertacije (latinica)

| Autor |
|---|
| Ime i prezime: Miona Glišić |
| Datum i mesto rođenja: 27.06.1993. |
| Sadašnje zaposlenje: Zavod za dentalnu medicinu Kragujevac |
| Doktorska disertacija |
| Naslov: ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI NOVOSINTETISANIH KOMPLEKSA PALADIJUMA(II) NA ĆELIJE SKVAMOCELULARNOG KARCINOMA USNE DUPLJE IN VITRO |
| Broj stranica: 91 |
| Broj slika: 9 grafikona, 7 slika i 2 tabele |
| Broj bibliografskih podataka: 255 |
| Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac |
| Naučna oblast (UDK): Medicina |
| Mentor: titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/instituta i univerziteta prof. dr Milan Zarić, vanredni profesor za užu naučnu oblast Medicinska biohemija Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu |
| Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije: Odluka broj IV-03-681/36 od 14.09.2023. |

Identifikaciona stranica doktorske disertacije na engleskom jeziku

| Author |
|---|
| Name and surname: Miona Glišić |
| Date and place of birth: 27.06.1993., Kragujevac, Serbia |
| Current employment: Institute of Dental Medicine, Kragujevac |
| Doctoral Dissertation |
| Title: THE CYTOTOXICITY OF NEWLY SYNTHESIZED PALLADIUM(II) COMPLEXES ON SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELLS IN VITRO |
| No. of pages: 91 |
| No. of images: 9 graphs, 7 images and 2 tables |
| No. of bibliographic data: 255 |
| Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac |
| Scientific area (UDK): Medicine |
| Mentor: title, name and surname, position, name of faculty / institute and university Prof. Milan Zarić, Associate Professor of Medical Biochemistry at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| Topic Application Date: April 11 th , 2023. |
| Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: Decision number: IV-03-681/36; Date of acceptance of the doctoral: 14.09.2023. |

*„Неизмерно сам захвална својој
породици на безграничној љубави и
подршци!“*

Сажетак

Најчешћи тип малигнитета усне дупље су сквамоцелуларни карциноми, малигни тумори који потичу од ћелија мукозе. Значај савремених хемиотерапеутика је немерљив у терапији, али услед појаве нежељених дејстава приликом њихове примене и појаве резистенције тумора на терапију је потрага за новим хемиотерапеутицима и даље актуелна.

Због тога је циљ нашег истраживања био испитивање антитуморског ефекта, као и механизма дејства новосинтетисаних динуклеарних комплекса паладијума: Pd1 ($([Pd(dien)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$) и Pd2 ($([Pd(dien)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$) на ћелијске линије: SCC-4 – сквамоцелуларни карцином језика и MRC-5 – фибробласти (контрола). Цисплатина и оксалиплатина су коришћени као референтни цитостатици.

Резултати наше студије су показали да тестирани комплекси паладијума, Pd1 и Pd2 делују цитотоксично на ћелије сквамоцелуларног карцинома језика SCC-4, а демонстрирају слабо цитотоксично дејство на испитиване фибробласте. Такође, ови комплекси индукују смањење вијабилности туморских ћелија активирањем програмиране ћелијске смрти. Поред тога, Pd1 и Pd2 значајно мењају однос проапоптотичног протеина bax и антиапоптотичног bcl-2 протеина код коришћених ћелија сквамоцелуларног карцинома језика SCC-4 тако што повећавају концентрацију bax протеина и смањују концентрацију bcl-2 протеина. Такође, Pd1 и Pd2 условљавају повећање процента ћелија које емитују флуоресценцу на каспазу-3.

Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II), Pd1 и Pd2 селективно смањују вијабилност ћелија сквамоцелуларног карцинома тако што ремете однос проапоптотичних и антиапоптотичних протеина и доводе до активације каспаза-зависног унутрашњег (митохондријалног) пута апоптозе.

Кључне речи: паладијум(II) комплекси, сквамоцелуларни карцином, малигнитети усне дупље, апоптоза, ћелијски циклус, цитотоксичност.

Summary

The most common type of malignancy of the oral cavity is squamous cell carcinoma, malignant tumors originating from mucosal cells. The importance of modern chemotherapeutics is immeasurable in therapy, but due to the occurrence of unwanted effects during their application and the emergence of tumor resistance to therapy, the search for new chemotherapeutics is still current.

Therefore, the goal of our research was to investigate the antitumor effect, as well as the mechanism of action of newly synthesized palladium dinuclear complexes: Pd1 ($[[\text{Pd}(\text{dien})]_2(\mu\text{-pz})](\text{ClO}_4)_4$) and Pd2 ($[[\text{Pd}(\text{dien})]_2(\mu\text{-pydz})](\text{ClO}_4)_4$) on cell lines: SCC-4 - squamous cell carcinoma of the tongue and MRC-5 - fibroblasts (control). Cisplatin and oxaliplatin were used as reference cytostatics.

The results of our research showed that our newly synthesized complexes of palladium(II), Pd1 and Pd2 have a strong cytotoxic effect on SCC-4 tongue squamous cell carcinoma cells, and have an insignificant cytotoxic effect on the tested, non-malignantly altered MRC-5 cells (fibroblasts). It has also been shown that these complexes reduce the viability of tumor cells by inducing apoptosis. In addition, Pd1 and Pd2 affect the relative ratio of proapoptotic protein bax and antiapoptotic bcl-2 protein in the examined SCC-4 tongue squamous cell carcinoma cells by increasing the percentage of active proapoptotic protein bax and decreasing the amount of antiapoptotic protein bcl-2 within the tumor cells. Also, Pd1 and Pd2 increase the percentage of cells emitting fluorescence for active caspase-3.

Our newly synthesized palladium(II) complexes, Pd1 and Pd2, selectively reduce the viability of squamous cell carcinoma cells by disrupting the ratio of proapoptotic and antiapoptotic proteins and leading to the activation of the caspase-dependent intrinsic (mitochondrial) apoptosis pathway.

Key words: palladium(II) complexes, squamous cell carcinoma, oral cavity malignancies, apoptosis, cytotoxicity.

САДРЖАЈ

| | |
|---|----|
| 1. УВОД | 1 |
| 1.1. МАЛИГНИ ТУМОРИ | 2 |
| 1.2. ОНКОГЕНЕЗА | 4 |
| 1.3. ПРОГРАМИРАНА ЋЕЛИЈСКА СМРТ | 7 |
| 1.4. МОРФОЛОШКИ ИЗГЛЕД АПОПТОТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ | 8 |
| 1.5. АПОТОЗА И НЕКРОЗА | 8 |
| 1.6. МЕХАНИЗАМ АПОПТОЗЕ | 9 |
| 1.7. УЛОГА АПОПТОЗЕ У ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА | 15 |
| 1.8. ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС | 16 |
| 1.8.1. <i>G1/S</i> фаза ћелијског циклуса | 18 |
| 1.8.2. <i>G2/M</i> фаза ћелијског циклуса | 18 |
| 1.9. СКВАМОЦЕЛУЛАРНИ КАРЦИНОМ | 19 |
| 1.10. КАРЦИНОМ ЈЕЗИКА | 20 |
| 1.11. АНТИТУМОРСКИ ЛЕКОВИ | 22 |
| 1.12. КОМПЛЕКСИ МЕТАЛА У АНТИТУМОРСКОЈ ТЕРАПИЈИ | 24 |
| 1.13. КОМПЛЕКСИ ПЛАТИНЕ И ЦИСПЛАТИНА | 26 |
| 1.14. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА | 29 |
| 2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА | 31 |
| 2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ | 32 |
| 2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ | 32 |
| 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ | 33 |
| 3.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ | 34 |
| 3.2. ИСПИТИВАНЕ ЋЕЛИЈЕ | 34 |
| 3.3. ТЕСТИРАНИ КОМПЛЕКСИ | 35 |
| 3.4. ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА | 36 |
| 3.5. МТТ ТЕСТ | 36 |
| 3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕЛАТИВНОГ ОДНОСА ЋЕЛИЈА КОЈЕ СЕ НАЛАЗЕ У АПОПТОЗИ И НЕКРОЗИ (<i>Annexin V/PI</i> тест) | 37 |
| 3.7. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА | 38 |
| 3.8. АНАЛИЗА ПРОТЕИНА АПОПТОЗЕ | 39 |
| 3.9. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА И ПРЕЗЕНТАЦИЈА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА | 40 |
| 4. РЕЗУЛТАТИ | 41 |

| | |
|--|-------------------------------------|
| 4.1. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ЋЕЛИЈЕ СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЈЕЗИКА | 42 |
| 4.2. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА МАЛИГНО НЕИЗМЕЊЕНЕ ЋЕЛИЈЕ ФИБРОБЛАСТА | 48 |
| 4.3. ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА АКТИВИРАЈУ ПРОЦЕС ПРОГРАМИРАНЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ ЋЕЛИЈА СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЈЕЗИКА, SCC-4 | 55 |
| 4.4. ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ ЗАСТОЈ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА SCC-4 ЋЕЛИЈА | 57 |
| 4.5. ТЕСТИРАНА ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА АКТИВИРАЈУ МИТОХОДРИЈАЛНИ АПОПТОТСКИ СИГНАЛНИ ПУТ | 59 |
| 5. ДИСКУСИЈА..... | 61 |
| 6. ЗАКЉУЧАК..... | 70 |
| 6.1. ГЛАВНИ ЗАКЉУЧАК | 71 |
| 6.2. ОСТАЛИ ЗАКЉУЧЦИ..... | 71 |
| 7. ЛИТЕРАТУРА..... | 73 |
| 8. ПРИЛОЗИ | Error! Bookmark not defined. |

1. УВОД

1.1. МАЛИГНИ ТУМОРИ

Канцер је болест у којој у телу оболелог долази до неконтролисане пролиферације као и ширења малигно трансформисаних ћелија (1). Малигне болести могу захватити сваки орган и обухватају више од стотину болести (1, 2). Карциноми су други по реду узрок смрти у развијеним земљама одмах након кардиоваскуларних болести (1, 3). Термин канцер, малигна неоплазма или малигни тумор су синоними и они се разликују од бенигнух тумора по дедиференцијацији, инвазивности и способности да метастазирају (2). У терапији канцера постоје три основна приступа, хирушка ексцизија, зрачење и хемиотерапија (2, 4). Хемиотерапија можемо применити самостално или као терапијски додатак (2). За адекватну терапију и потпуно излечење од есенцијалног значаја је што раније дијагностиковање, односно рано откривање постојећих малигнитета.

Већина туморских ћелија садржи већи број мутација, односно у туморским ћелијама су детектоване мултипле мутације (5, 6). Такође, малигне ћелије имају својства слична феталним ћелијама које још нису почеле процес диференцијације и сазревања (6, 7). Не само да постоји неспособност малигнух ћелија да врше адекватно своје функције, већ канцерска ћелија у борби за преживљавање кристи природну мутабилност и природну селекцију да би постигла „предност“ над малигно неизмењеним ћелијама (7). У физиолошким условима при деству многобројних и разноврсних етиолошких фактора настају и мања ћелијска оштећења, која не доводе до некротске већ до индукције апоптотске смрти захваћених ћелија, мутације у генима који омогућавају апоптозу могу бити праћене акумулацијом и настанком тумора (8).

Према најновијим доступним подацима, објављеним од стране *NCI, National Cancer Institute* само у 2020. години код више од два милиона људи је дијагностикован различит тип канцера (9). Исте године, регистровано је преко шестохиљада смртних случајева (9). Према статистичким подацима објављеним од стране *World Cancer Research Fund International*, најчешће дијагностиковани карциноми у 2020. години код оба пола су карцином дојке, карцином плућа и колоректални карцином (10). Код мушкараца најчешћа три дијагностикована малигнитета у 2020. години су карцином плућа, карцином простате и колоректални карцином (10). Насупрот томе код жена у 2020. години најчешће дијагностиковани малигнитети су карцином дојке, колоректални карцином и карцином цервикса (10).

Главни узроци високе стопе смртности код оболелих од карцинома су одсуство раних симптома и касно постављање дијагнозе. Додатни проблем представља чињеница да веома често и након благовремене и најсавременије трапије не може доћи до потпуног излечења. Из претходно наведених разлога сматра се да је за успешну терапију неопходно што детаљније познавање веома сложеног процеса канцерогенезе. Стога, нова, савремена истраживања имају задатак да што детаљније и прецизније дефинишу сам процес канцерогенезе, а све у циљу проналажења адекватне терапије.

Карциноми усне дупље су на шестом месту по учесталости свих типова малигнитета. Најчешћи тип малигнитета усне дупље су сквамозелуларни карциноми, малигни тумори који потичу од ћелија мукозе. Најчешћа локализација интраоралних сквамозелуларних карцинома је бочна ивица и вентрална површина језика. Узроци који доводе до појаве сквамозелуларног карцинома усне дупље су бројни, а међу њима

спадају лоша хигијена усне дупље и траума. Огроман значај у лечењу ових промена имају рана дијагноза и адекватна терапија.

Највећи број пацијената који имају градус I - IVa карцинома усне дупље се подвргавају хируршкој терапији или хеморадијационој терапији. С друге стране, пацијенти који имају карциноме усне дупље градуса IVb или IVc бивају подвгнути само комбинацији зрачне и хемиотерапије, а зависно од општег статуса организма, често је хемиотерапија једини терапијски приступ. Стога је и у стоматологији, као и у другим гранама медицине немерљив значај савремених хемиотерапеутика (9, 10).

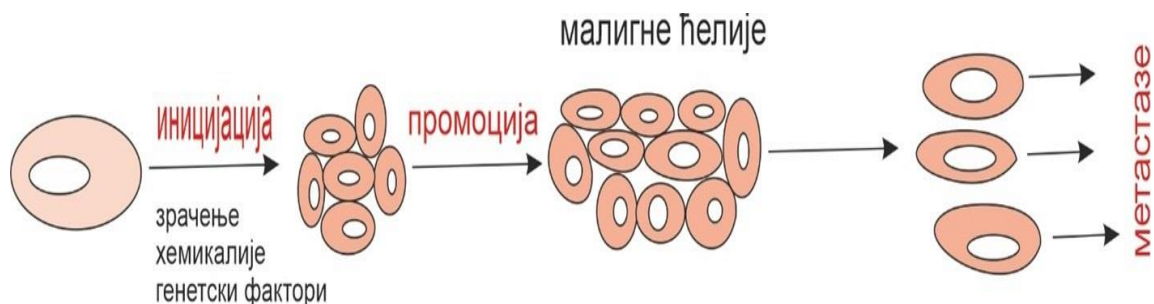
1.2. ОНКОГЕНЕЗА

Тумор није јединствена болест и не постоји само један узрочник који изазива настанак тумора (11-13). Фактори који узрокују настанак тумора су многобројни и разноврсни, а обухваћени су заједничким називом канцерогени фактори (2, 7). Највероватније је претпоставка да у току индукције туморског процеса долази до интеракције између више фактора ризика или поновљеног излагања једном истом канцерогену (7, 14). Комбинација поједних фактора ризика је повезана са одређеним облицима тумора (2).

Малигна трансформација ћелија настаје услед једне или више мутација у молекулу *ДНК* (15, 17). Мутације у молекулу *ДНК* ћелије могу бити стечене или наследне (2, 18). Процес малигне трансформације је веома сложен, вишестепени процес, који укључује не само промене на нивоу *ДНК* већ више епигенетских фактора као што су деловање хормона, ко-карциногена, промотера и др (19, 20). Ови фактори сами по себи нису примарни узрок настанка канцера, али могу знатно повећати могућност да генетске мутације на крају резултирају развојем малигнитета. Иако све типове малигнитета можемо сврстати у генетске болести треба напоменути да већина канцера није наследне природе (21).

Веома је битна чињеница да малигно измењене ћелије карактерише неконтролисани раст, при чему се јавља висок степен резистенције на физиолошке регулацијске механизме за раст и пролиферацију (22, 23). Инфилтрација малигнућелија у околно ткиво и разарање истог може довести до тога да захваћено ткиво постане инсуфицијентно. Међусобни контакт канцерских ћелија је слабији у односу на малигно неизмењене ћелије чиме је омогућено њихово ширење на друга места у организму где настављају раст (метастазе) (24-26).

Малигна трансформација је веома сложен процес који пролази кроз више стадијума (слика 1). Први, иререверзибилни стадијум је назван иницијација (1, 27). У овом стадијуму долази до настанка од једне моноклоналне малигно преображене ћелије више клонова малигнућелија (7, 27). Други стадијум у канцерогенези је реверзибилни и назван је промоција (28, 29). Овај стадијум у потпуности зависи од степена деловања штетних фактора који доприносе развоју канцерогенезе. Трећи стадијум се назива прогресија, представља иререверзибилан процес где су јасно уочљиве све геномске промене и ствара се примарни, локални тумор (27). Четврти стадијум је заправо метастазирање што представља ширење малигнућелија на удаљена места у организму (30, 31).



Слика 1. Фазе у процесу канцерогенезе

Године 1914. Бовери је промовисао теорију да ћелије постају малигно трансформисане као последица прекомерне активације гена који промовишу ћелијску деобу или је узрок потпуни губитак функције гена који нормално спречавају раст ћелија (32, 33). Стога, можемо недвосмислено закључити да постоје две главне групе генских поромена које резултирају настанком канцера, активација протоонкогена у онкогене и инактивација гена супресије тумора (33-35). Прецизније, гени чија је улога у промоцији ћелијског раста називају се протоонкогени, а уколико дође до активације ових гена путем *point* мутација, амплификација или поремећаја регулације конвертују се у онкогене (36-38). Гени, физиолошки задужени да спрече раст ћелија називају се тумор супресиори, услед губитка њихове функције последично се јавља неконтролисани и убрзани ћелијски раст (39-41). Такође, треба поменути и трећу групу гена који су укључени у патогенезу малигнитета коју називамо гени за репарацију ДНК молекула. Ензим ДНК полимераза има лимитирану стопу поправке грешака у молекулу ДНК што може бити још један од механизма настанка канцерске ћелије (42, 43). Када механизми поправке не функционишу стопа нагомилавања мутације расте са сваком ћелијском деобом.

Први детектовани онкогени су *ras* онкогени (7, 44). Кодирају протеине молекуларне масе 21 kDa који се налазе на унутрашњој површини ћелијске мембране (44, 45). Ови p21 протеини имају могућност везивања GTP и GDP-а и учествују у преносу митогених сигнала (46, 47). Тачкаста мутација на молекулу ДНК доводи до настанка *ras* онкогена, чиме је такође омогућена неконтролисана ћелијска пролиферација (7). Различити типови малигнитета се повезују са активношћу *ras* онкогена као што су: акутна мијелоидна леукемија, тумор плућа, тумор панкреаса (38). Мутације у једном од *ras* гена, H-ras налазе се у 85% канцера панкреаса. Такође, активност *ras* онкогена је детектована код полипа колона, што је практично преканцерска фаза у настанку карцинома колона (7).

Протоокоген *c-erb B-2* кодира трансмембрански протеин молекуларне масе 185 kDa који је експримиран на епителним ћелијама а сличан је рецептору за епидермални фактор раста (*EGFR*). Амплификација *c-erb B-2* у онкоген детектована је код карцинома дојке, јајника и гастроинтестиналног тракта (7, 48, 49).

Продукт *bcl-2* онкогена је заправо мембрански интегрални протеин локализован у спољашњој митохондријалној мембрани, као и у мембрани ендоплазматског ретикулума (7, 50). Протеин *bcl-2* има есенцијалну улогу у спречавању програмиране ћелијске смрти (51, 52). Абнормална експресија *bcl-2* гена детектована је у раној фази тумора ректума, а Bcl-2 онкопротеин је детектован у повећаној концентрацији код различитих хематолошких малигнитета (53, 54, 55).

Траслокација *abl* протоонкогена са хромозома 9 на хромозом 22 (9:22) је детектована у хроничној мијелоидној леукемији. Последица претходно поменуте транслокације је неконтролисана пролиферација ћелија (56-59).

Тумор супресорски гени су најчешће одговорни за наследне канцерске синдроме. Заједничка обележја за све тумор супресорске гене су: герминативна мутација која погађа један алел изазива губитак функције, тумори испољавају губитак другог алела као последицу соматске мутације, нормална функција гена је спречавање неконтролисаног ћелијског раста (2).

Ретинобластомски ген (*RB*) је тумор супресорски ген, инактивирајућа мутација захвата један алел *RB* гена на хромозому 13 у породицама које испољавају доминантно наслеђивање подложности за ретинобластом (60, 61).

Тумор супресорски ген чије оштећење је од есенцијалног значаја за процес канцерогенезе и формирање солидних тумора је *p53* ген на хромозому 17 *p* (62-65). Истраживања су показала да су мутације *p53* гена детектоване код половине укупно дијагностикованих тумора (7). Герминативне мутације *p53* гена доводе до фенотипског испољавања познатог као *Li-Fraumenijev* синдром кога карактерише стварање различитих саркома, тумора мозга и леукемија (66, 67).

Референтни подаци недвосмислено указују да особе код којих је дијагностикован карцином дојке или карцином оваријума наслеђују гене, који их чине подложним за развој претходно поменутих малигнитета. Методом позиционог клонирања два гена су откривена *BRCA 1* и *BRCA 2* (68, 69). Локализација *BRCA 1* гена је на хромозому 17, а мутација овог гена ствара висок ризик (85% током живота) за развој канцера дојке или оваријума (50% током живота) (7, 69). Такође, значајан податак је да мушкарци носиоци *BRCA 1* мутације имају повећан ризик за развој канцера простате (70). Локализација *BRCA 2* гена је на хромозому 13, а мутација овог гена носи ризик за настанак карцинома дојке и оваријума. Учесталост *BRCA 2* мутације је упола мања од учесталости *BRCA 1* (7, 71).

Услед неконтролисане убрзане деобе, метаболизам малигнућелија се разликује у односу на метаболизам малигну неизмењених ћелија (72). У малигнућелијама појачана је синтеза молекула *ДНК*, као и синтеза нуклеотида. Сходно томе, повећана је активност ензима који учествују у синтези *ДНК* молекула као што су лигазе, нуклеазе, *ДНК* полимеразе (73, 74). У митохондријама су присутни димери *ДНК* карактеристични за туморске ћелије (75). Такође, детектована је и појачана синтеза *РНК* молекула као и повећан степен активности ензима *РНК* полимеразе (76). Појављује се *mРНК* за онкофеталне протеине. Услед стимулације синтезе *РНК* молекула забележен је и појчан степен метаболизма полиамина (7).

Метаболизам малигну измењених ћелија обухвата и појачану синтезу протеина (77, 78). Такође, у веома малој количини су присутни ензими чије активности подлежу хормонској регулацији или другим механизмима регулације, уместо њих присутни су у већој концентрацији ензими и протеини карактеристични за феталне ћелије (7, 78). Изразито је присутна повечана активност колагеназе, чиме малигна ћелија има могућност деструкције околног ткива. Прецизније, малигнућелије појачано отпуштају протеолитичке ензиме (79, 80).

Малигнућелије садрже мањи број митохондрија, уз промењен састав мембранских протеина и липида. Такође, повећан је унос и смањено је отпуштање калцијума из митохондрија (81). Појачан је процес липидне пероксидације, услед нагомилавања реактивних кисеоничних врста и смањене активности пероксид дисмутазе (82, 83). Глукоза је супстрат за пентозо-монфосфатни пут, а овим метаболичким путем малигнућелије стварају пентозе са синтезу нуклеотида (84, 85). За разлику од малигну неизмењених ћелија доминантан метаболички пут код канцерских ћелија је анаеробна гликолиза. Процесом анаеробне гликолизе малигнућелије добијају довољно енергије за све метаболичке процесе (86-89).

У структури плазма и митохондријалне мембране малигнућелија има више холестерола и мање незасићених масних киселина. Такође, проценат гликолипида је значајно мањи. Транспорт глукозе, аминокиселина и јона кроз ћелијску мембрану је

појачан, тиме се повећава понуда супстрата, што додатно доприноси појачаној пролиферацији (90).

Услед недостатка фибронектина смањена је адхезивност малигно измењених ћелија, што погодује стварању удаљених метастаза (91, 92). Након што се услед смањене активности неке малигне ћелије одвоје од туморске масе, оне се путем крви или лимфом преносе на друге удаљене органе. Секундарни тумори чешће настају у тачно одређеним ткивима, на пример метастатске промене код карцинома дојке се детектују највише у костима, мозгу и плућима (7).

Развој малигнитета омогућен је захваљујући патолошкој ангиогенези која траје месецима или годинама и омогућава раст и прогресију тумора. Раст солидних тумора у потпуности зависи од прокрвљености околине. Тумори пречника 1 до 2 mm могу се хранити дифузијом хранљивих састојака околине, али за сваки даљи раст неопходан је даљи развој крвних судова. Ангиогенеза је последица одговора на факторе раста које сам тумор производи током раста (2).

Велики број потенцијалних хемиотерапеутика који су у клиничким истраживањима се базира на дефинисаним концептима онкогенезе, патолошке ангиогенезе, односно ћелијске биологије тумора (2, 4).

1.3. ПРОГРАМИРАНА ЋЕЛИЈСКА СМРТ

Апоптоза означава облик програмиране ћелијске смрти који има есенцијалну улогу у физиолошким и у патолошким процесима у организму (93, 94). Термин апоптоза је први пут коришћен од стране научника *Kerr*-а и *Currie*-а 1972. године, приликом чега је први пут детаљно описана посебна морфолошка форма програмиране ћелијске смрти (95). Касније, новија истраживања су показала изузетан значај програмиране ћелијске смрти код ћелија које имају алтерације у молекулу *ДНК*.

У физиолошким условима у организму процес апоптозе је кључан приликом развоја и старења ћелија, а све у циљу одржавања хомеостазе, односно сталне ћелијске популације у ткивима (96). Програмирана ћелијска смрт је од есенцијалног значаја и приликом имунских реакција, такође и код оштећења ћелија различитим штетним агенсима. Зрачење, као и коришћење лекова у терапији малигнитета, могу условити оштећење *ДНК* молекула код неких ћелија, приликом чега ће се активирати процес апоптозе кроз *p53*-зависни пут (96, 97). Такође, неки хормони попут кортикостероида могу бити стимулус са активацију програмиране ћелијске смрти (98). Ћелије на својој плазма мембрани експримирају *Fas* или *TNF* рецепторе, где услед везивања одговарајућих лиганата може доћи до активације програмиране ћелијске смрти (99, 100).

Од есенцијалног значаја је разликовање процеса програмиране ћелијске смрти и некрозе. Некроза је патолошки процес код кога се јавља запаљенска реакција, услед чега долази до лизе ћелија и јавља се као последица топлотног оштећења, радијације, хипоксије и др (100-103). У неким случајевима тип и интензитет стимулуса могу бити одлучујући фактори који ће дефинисати да ли ће ћелија активирати процес апоптозе или процес некрозе. На пример, приликом мањег интензитета зрачења долази до оштећења ћелија и активације апоптозе, док приликом излагања ћелија већој дози зрачења активиран је процес некрозе (104). Апоптоза је веома прецизно кординисан и врло често

енергентски завистан процес који укључује активацију цитеин протеаза, названих каспазе, а у све у циљу „ коначне ћелијске смрти“ (105, 106).

1.4. МОРФОЛОШКИ ИЗГЛЕД АПОПТОТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Применом електронског микроскопа се веома јасно и детаљно могу дефинисати морфолошке промене које се дешавају у ћелијама приликом активације апоптозе (107, 108). Током ране фазе апоптозе јасно се може детектовати смањење површине ћелије и пикноза. Пикноза настаје као последица кондензације хроматина. Такође, цитоплазма је кондензована, док су ћелијске органеле позициониране веома близу једна поред друге (109-111). Како процес апоптозе напредује, карактеристично је формирање протузија на плазма мембрани ћелије и фрагментисање једра, а све у циљу формирања апоптотских тела. Апоптотска тела у својој структури садрже уско паковане органеле са или без нуклеарних фрагмената. Интегритет ћелијских органела је одржан унутар плазма мембране. Последња фаза у овом веома прецизно контролисаном процесу је фагоцитоза апоптотских тела коју врше макрофаги (112-114).

Веома битна чињеница је да не постоји инфламаторна реакција повезана са процесом апоптозе, у прилог томе је чињеница да апоптотска тела не продукују медијаторе запаљенских реакција. Апоптотска тела се веома брзо фагоцитују чиме је спречена секундарна некроза (115-118).

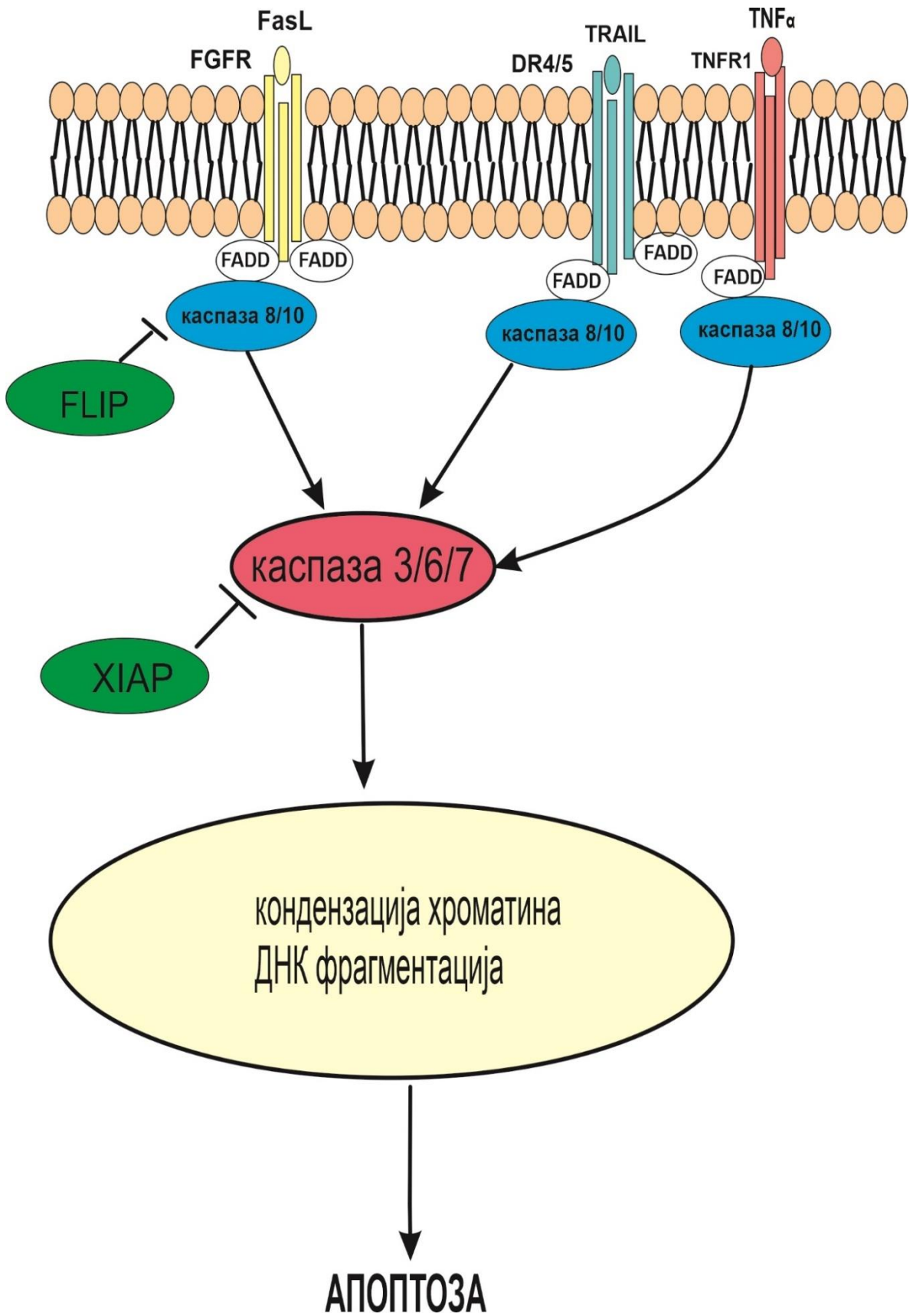
1.5. АПОТОЗА И НЕКРОЗА

Алтернатива апоптози је некроза за коју је јасно дефинисано да је патолошки процес, где је ћелија „пасивна“ жртва и долази до запаљенске реакције (119). Прецизније, некроза је неконтролисани, пасивни процес који обухвата већи број ћелија, док је апоптоза регулисан, енергетски завистан пут који погађа појединачне ћелије. Процес некрозе је најчешће активиран путем два главна механизма: недовољно снабдевање ћелија енергијом и директно оштећење ћелијске мембране (119, 120). Главне морфолошке промене у ћелији које се јављају након активације процеса некрозе су бубрење ћелије, формирање цитоплазматских вакуола, проширени ендолплазматски ретикулум, оштећење митохондрија, одвајање рибозома, руптура лизозома и на крају нарушавање интегритета плазма мембране (119-121). Након губитка интегритета ћелијске мембране, садржај цитоплазме прелази из ћелије у околно ткиво чиме долази до активације запаљенског процеса као и последичног оштећења околног ткива. За разлику од некрозе, апоптотичне ћелије не продукују цитокине, и веома брзо се фагоцитују од стране макрофага, тако да не постоји инфламаторна реакције нити оштећење околног ткива (121, 122).

1.6. МЕХАНИЗАМ АПОПТОЗЕ

Сам механизам апоптозе је веома комплексан процес и укључује енергетски зависну сложену молекуларну каскаду. Постоје два јасно дефинисана пута, спољашњи пут (активација рецептора смрти) као и унутрашњи пут (митохондријални) (123). Веома је битна чињеница да су спољашњи и унутрашњи апоптотски пут повезани и појединим молекулима који могу учествовати и имају значајну улогу у оба поменута апоптотска пута (123, 124). Такође, постоји посебан трећи апоптотски пут активиран од стране цитотоксичних Т лимфоцита уз помоћ цитотоксичних супстанци перфорина и гранзима. Перфорин/гранзим апоптотски пут може активирати апоптотски пут посредством гранзима Б или гранзима А (125, 126). Поменути путеви воде ка активацији каспазе-3, ДНК фрагментацији, деградацији цитоскелета и нуклераних протеина, формирању апоптотских тела и фагоцитози од стране макрофага (127). Изузетак је гранзим А апоптотски пут који индукује каспаза независну програмирану ћелијску смрт (125,126).

Спољашњи апоптотски пут је активиран везивањем одговарајућег лиганда за трансмембранске рецепторе који су класификовани у групу рецептора смрти (слика 2). Прецизније, рецептори смрти који активирају спољашњи пут апоптозе спадају у *TNF* (енг. *TNF, tumor necrosis factor receptor*) суперфамилију рецептора (128-130). Заједничко за све *TNF* рецепторе је да у својој структури садрже домен богат цистеином (екстрацелуларни домен) и цитоплазматски сегмент изграђен од 80 аминокиселина назван *DED* (енг. *DED, death effector domains*) (130,131). Интрацелуларни домен смрти *DED* игра есенцијалну улогу у преносу „сигнала смрти“ од ћелијске површине до унутарћелијских сигналних апоптотских путева. Најпознатији рецептори смрти који са одговарајућим лигандима активирају спољашњи апоптотски пут су *FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 and Apo2L/DR5* (132,133).



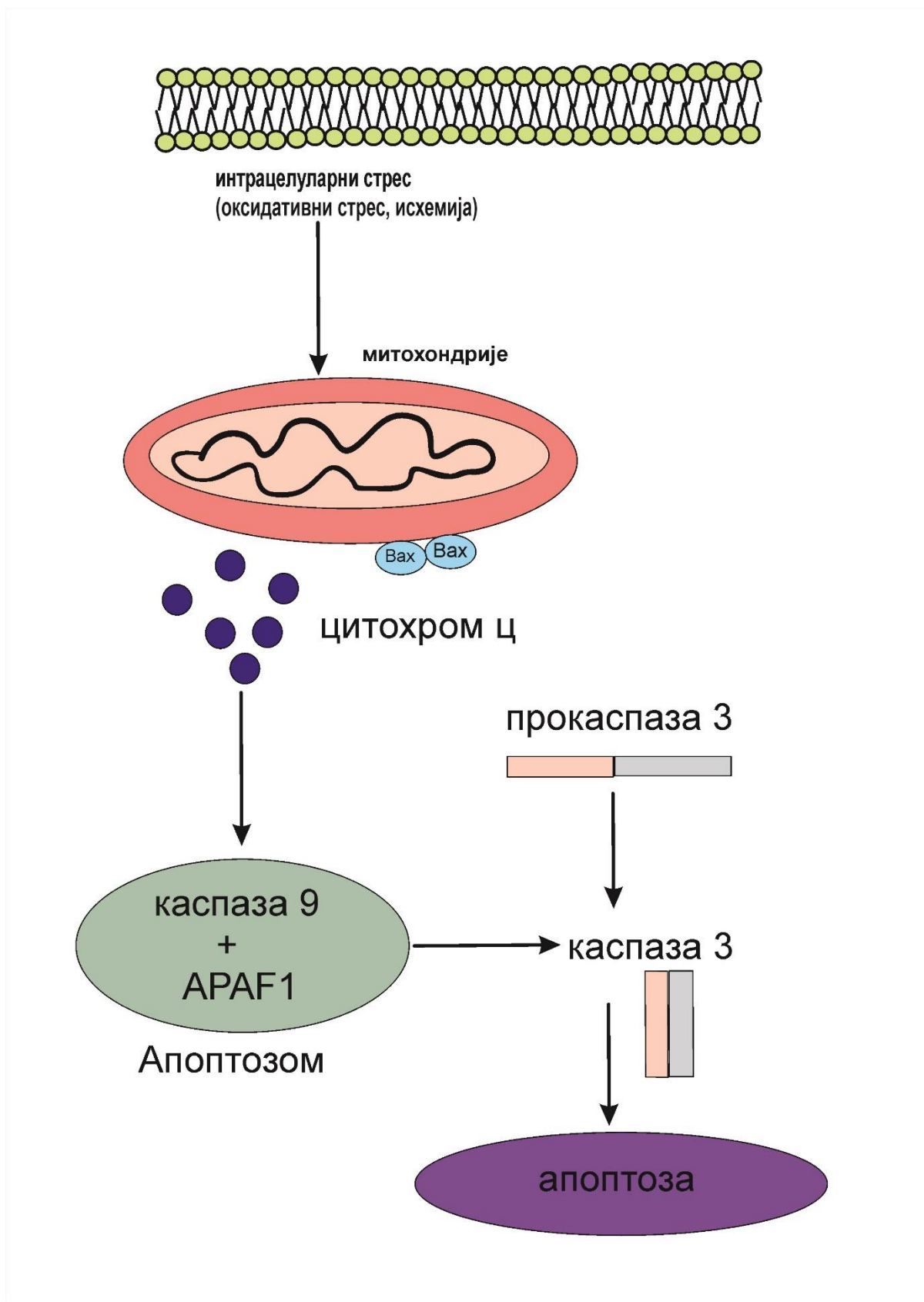
Слика 2. Активација спољашњег апоптотског пута

Најдетаљаније објашњени и дефинисани спољашњи апоптотски пут је *FasL/FasR* и *TNF- α /TNFR1* модел (134, 135). Активација ових модела започиње везивањем одговарајућег лиганда за рецептор. Након везивања лиганда долази до активације и везивања цитоплазматских адаптерних молекула *FADD* (енг. *FADD, Fas associated death domain*) за цитоплазматски *DED* домен. У следећем кораку, *FADD* се спаја са неактивном формом прокаспазе 8, долази до формирања *DISC* (енг. *DISC, death-inducing signaling complex*) комплекса што за последицу има аутокаталитичку активацију прокаспазе 8. Након конвертовања прокаспазе-8 у активну капсазу-8, егзекуциона фаза програмиране ћелијске смрти је активирана (136, 137). Интрацелуларни домен смрти *DED* може бити инхибиран протеином *c-FLIP* (енг. *c-FLIP, FLICE-inhibitory protein*), који се може везати за *FADD* и прокаспазу-8 чиме се спречава егзекуциона фаза апоптозе (138, 139). Такође, регулаторни протеин назван *Toso* блокира *FasL/FasR* индуковану апоптозу инхибицијом активности капсазе-8 (140, 141).

Унутрашњи митохондријални пут није рецептором индукован пут за разлику од спољашњег пута, стимулус смрти активира унутарћелијске сигналне путеве што доводи до последичног оштећења митохондрија (слика 3). Стимулуси који активирају унутрашњи пут апоптозе могу бити позитивни или негативни. Негативни стимулуси укључују одсуство фактора раста, хормона, цитокина, услед чега долази до немогућности инхибиције процеса апоптозе (142-144). Позитивни стимулуси који активирају унутрашњи пут апоптозе су зрачење, токсини, хипоксија, хипертермија вирусне инфекције и повећана продукција реактивних кисеоничних врста. Позитивни и негативни стимулуси који активирају митохондријални пут доводе до промена у структури унутрашње митохондријалне мембране, стварају се поре, нарушава се мировни мембрански потенцијал и ослобађају се две групе проапоптотских протеина из митохондрија у цитосол ћелије (145, 146).

У прву групу проапоптотских протеина спадају цитохром ц, *Smac/DIABLO* и *HtrA2/Omi* (147, 148). Заједничка особина претходно наведених протеина је да индукују апоптозу капсаза-зависним митохондријалним путем. Цитохром ц се везује за молекулу *APAF1*, што за последицу има конвертовање прокаспазе 9 у активну форму, капсазу-9. Каспаза-9 активира егзекуторну каспазу-3 што за резултат има стварање апоптотских тела. Протеини *Smac/DIABLO* и *HtrA2/Omi* имају улогу у активирању унутрашњег митохондријалног пута инхибицијом протеина *IAP* (*IAP*, енг. *inhibitors of apoptosis proteins*) (149, 150).

У другу групу проапоптотских протеина спадају *AIF*, *ендонуклеаза G* и *CAD*, ослобађају се из митохондрија током апоптозе, али у касној фази програмиране ћелијске смрти. Протеин *AIF* урокује *ДНК* фрагментацију као и кондензацију хроматина. Проапоптотски протеини *AIF* *ендонуклеаза G* функционишу независно од активације капсаза (151, 152).



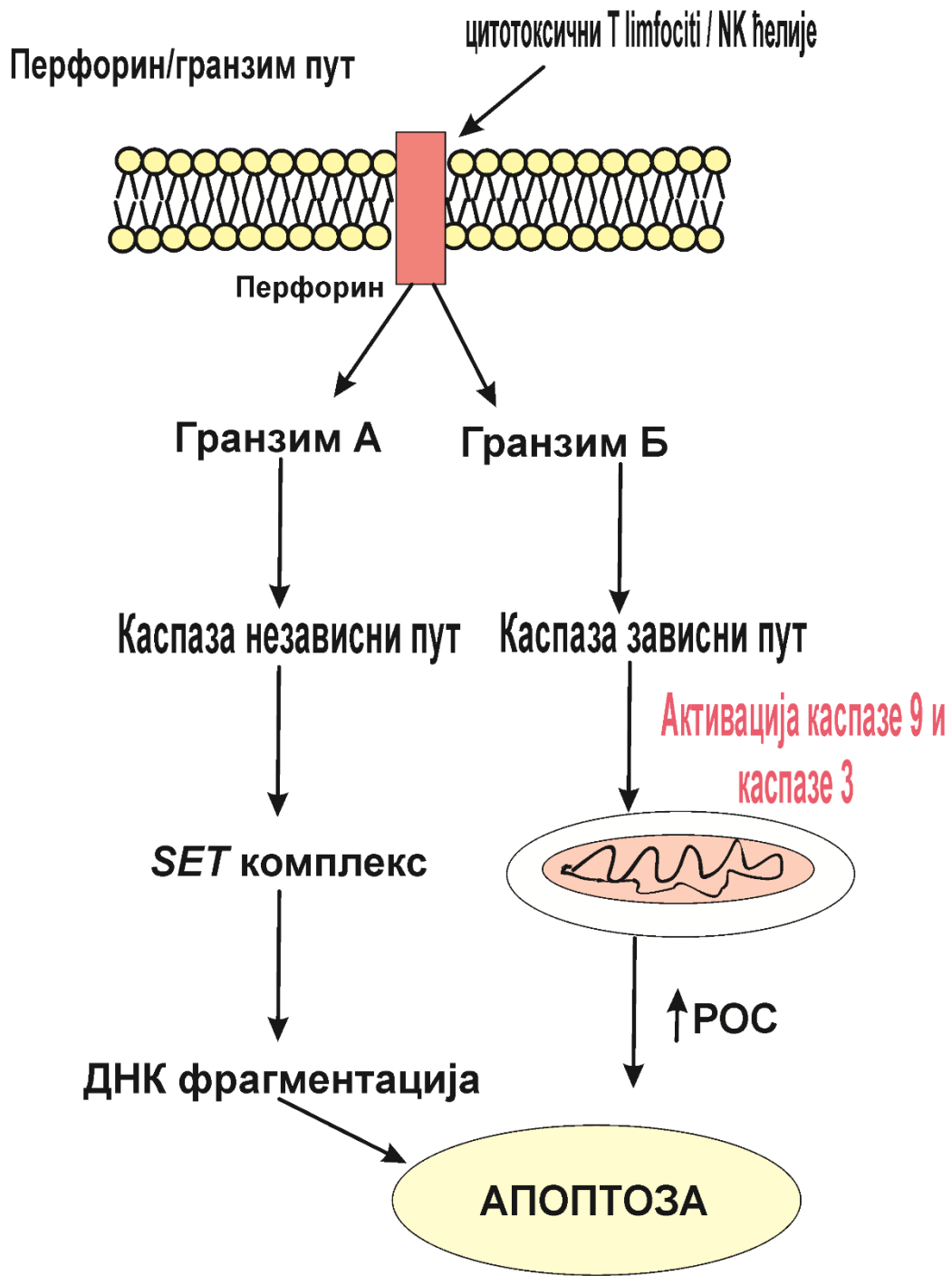
Слика 3. Активација унутрашњег митохондријалног пута

Есенцијалну улогу у контроли активације унутрашњег митохондријалног пута имају протеини *Bcl-2* фамилије, док протеин *p53* има кључну улогу у регулацији синтезе ових протеина (153). Протеини *Bcl-2* фамилије контролишу пропустљивост митохондријалне мембране и на основу улоге можемо их поделити на проапоптотске и антиапоптотске. У гупу протеина који спречавају процес покретања митохондријалног пута убрајамо *Bcl-2*, *Bcl-x*, *Bcl-XL*, *Bcl-XS*, *Bcl-w*, *BAG* (154-156). Протеини који учествују у активацији унутрашњег пута програмиране ћелијске смрти су *Bcl-10*, *Bax*, *Bak*, *Bid*, *Bad*, *Bim*, *Bik*, *Blk* (157, 158). Од концентрације претходно поменутих протеина директно зависи да ли ће ћелија активирати унутрашњи митохондријални пут или ће се процес апоптозе инхибирати. Прецизније, главна улога протеина *Bcl-2* фамилије је у контроли ослобађања цитохрома *c* који је локализован у митохондријама. Постоји неколико описаних механизма који су описани приликом активације унутрашњег пута програмиране ћелијске смрти (144, 154). Митохондријално оштећење у *FAS* путу апоптозе активира каспазу 8 и проапоптотски *Bid* протеин, чиме се јасно указује на повезаност спољашњег и унутрашњег пута. Антиапоптотски протеини *Bcl-2* и *Bcl-XL* спречавају ослобађање цитохрома *c* из митохондрија у цитосол, на тај начин што инхибирају активацију каспаза (159).

Молекули *Puma* и *Noxa* такође спадају у *Bcl-2* фамилију протеина и имају улогу у активацији унутрашњег митохондријалног пута (160, 161). Есенцијалну улогу у активацији унутрашњег митохондријалног пута има *Bax* протеин. Прецизније, након активације *Bax* протеина, олигомерна форма формира поре у митохондријалној мембрани чиме се јасно стичу услови за ослобађање цитохрома *c* (162, 163).

Специфичне протеазе које имају кључну улогу у унутрашњем и спољашњем апоптотском путу су каспазе. Једном активирани, каспазе воде ка иреверзибилној фази програмиране ћелијске смрти (164, 165). У односу на њихову функцију у ћелији каспазе смо поделили у три групе. Прва група су иницијаторске каспазе и у ову групу спадају каспаза-2, каспаза-8, каспаза-9 и каспаза-10. Другу групу чине егзекуторске каспазе и у ову групу спадају каспаза-3, каспаза-6 и каспаза-7 (166). Последњу, трећу групу чине инфламаторне каспазе и то су каспаза-1, каспаза-4 и каспаза-5 (167). Друге каспазе које су идентификоване чије улога је и даље предмет истраживања су каспаза-11 -сматра се да има улогу у апоптози и матурацији цитокина, каспаза-12 -има улогу у апоптози преко ендоплазматског ретиклума, каспаза-14 -детектована је у ембрионалном ткиву (168-170). Есенцијални значај у процесу програмиране ћелијске смрти је модел „сарадње“ између иницијаторских каспаза, чијом каталитичком активношћу долази до активирања ефекторских каспаза. Прецизније, долази до конформационих промена егзекуторских каспаза што за последицу има ћелијску смрт (171).

Посебан апоптотски пут је активиран од стране цитотоксичних Т лимфоцита уз помоћ гранозима А и гранозима Б (слика 4) (172, 173). Активна форма гранозима А условљава цепање *ДНК* молекула и активацију програмиране ћелијске смрти (173). Гранозим Б активира каспазу-10 и каспазу-3 чиме је омогућена деградација *ДНК* молекула и активација процеса апоптозе (172).



Слика 4. Активација апоптозе, перфорин/гранзим пут

1.7. УЛОГА АПОПТОЗЕ У ПАТОЛОШКИМ СТАЊИМА

Основ канцерогенезе и развоја малигнитета је поремећај у регулацији апоптозе као и поремећај у регулацији ћелијског циклуса. Стога, јасно је да већина малигнућ ћелија има могућност да користи различите молекуларне механизме у циљу инхибиције процеса апоптозе (174). Различите студије су показале да код малигнућ измењених ћелија се јавља повећана концентрација антиапоптотског *Bcl-2* протеина као и смањена концентрација *Bax* протеина (175).

Алцхајмерова болест је хронична неуродегеративна болест код које долази до патолошке акумулације амилоида β услед чега се јавља неуротоксичност. Студије су показале да нагомилавање амилоида β има за последицу активацију процеса апоптозе *Fas* сигналиним путем и повећава се продукција реактивних кисеоничних врста у неуронима (176).

Код пацијената са ХИВ инфекцијом $CD4^+$ Т лимфоцити који у себи садрже вирус показују повећану експресију *Fas* рецептора што за последицу има активацију процеса апоптозе (177).

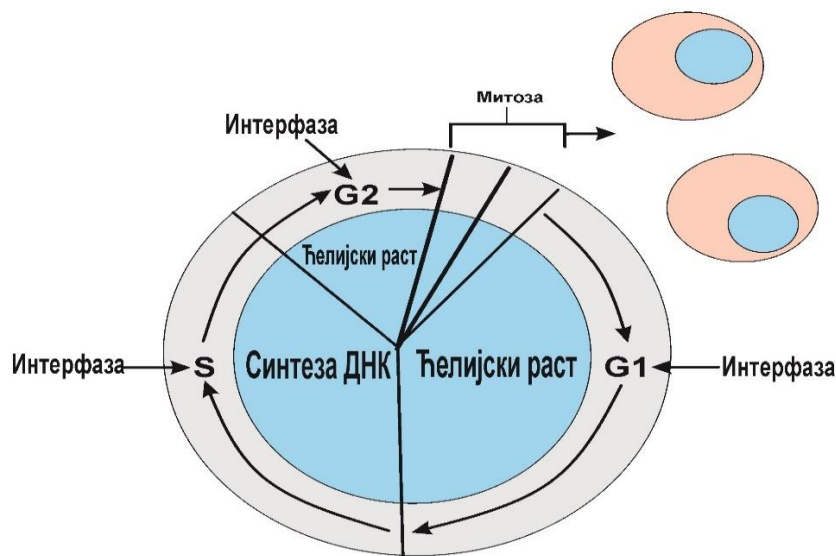
Хантингтонова болест је аутозомно-доминантно неуродегенеративно обољење које се карактерише невољним покретима и деменцијом као резултат губитка неурона у стријатуму и церебралном кортексу. У основи ове болести је експанзија Хантингтоновог гена који кодира протеин који садржи понављајући полиглутамински сегмент (poly-Q). Прецизније, у неуронима се стварају патолошки протеински агрегати који могу активирати каспазе. Стога, основни проблем у Хантингтоновој болести је апоптоза неурона, при чему долази до дефицита можданих ћелија и јављају се неуродегенеративни поремећаји (178).

Регулација концентрације глукозе у крви зависи од два хормона инсулина и глукагона. Глукагон и инсулин се синтетишу у α и β ћелијама Лангерхансових острваца. Сматра се да у развоју дијабетеса тип 1 централну улогу има апоптоза β ћелија, односно активација програмиране ћелијске смрти. Прецизније, долази до активације спољашњег апоптотичног пута од стране Т лимфоцита, затим долази до активирања каспазе-8, -10 што за последицу има формирање *DISC* (енг. *DISC, death-inducing signaling complex*). Комплекс *DISC* служи као „молекуларна основа“ за активацију ефекторских каспаза -3, -6 и -7 (179).

Појачана активација процеса апоптозе је детектована и у исхемијским болестима (180). Код миокардне исхемије је узрокована смањеним протоком крви (чиме је смањен доток кисеоника) долази до апоптозе миоцита. Сматра се да тек након пролонгиране исхемије долази до активације процеса некрозе (181). Постоје јасни докази који указују да је у почетном стадијуму исхемијске болести детектована повећана продукција проапоптотског *Bax* протеина (182).

1.8. ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС

Ћелија пролази кроз каскадне реакције у циљу поделе на две нове („ћерке“) ћелије (слика 4). Како би сам ћелијски циклус био активиран непоходно је дејство стимулирајућег фактора. Такође, постоје и фактори који успоравају или потпуно онемогућавају активацију ћелијског циклуса (183). Да би се ћелијски циклус комплетно одиграо неопходно је да прође четири фазе G_1 (енг. *Gap phase 1*), S (енг. *Synthesis*), G_2 (енг. *Gap phase 2*) и M (енг. *Mitosis*). Временски период између две деобе називамо интерфаза (184, 185). Након завршетка процеса митозе процентуално највећи број ћелија се налази у фази мировања G_0 , а након дејства одговарајућих фактора долази до терминалне диференцијације улед чега код одређених типова ћелија долази до потпуног губитка способности деобе. Пример за овак вид функционисања су нервне ћелије и кардиомиоцити (186). Лимфоцити су у G_0 фази ћелијског циклуса све док не дође до стимулације специфичним антигеном или цитокинима. За разлику од лимфоцита, неутрофили потпуно губе способност враћања G_1 фазу након уласка фазу мировања (G_0 фазу) (187, 188). Са друге стране, у ткивима где се ћелије интензивно деле одмах након M фазе ћелијског циклуса, ћелије улазе у G_1 фазу где се припремају за нову деобу. Да би се након G_1 фазе одиграла у S фазу ћелијског циклуса неопходна је стимулација фактора раста. Уколико стимулација фактором раста изостане ћелија има два пута, или продужава G_1 фазу или прелази у G_0 фазу (183).



Слика 5. Фазе ћелијског циклуса

За G_1 ћелијску фазу карактеристичан је пораст величине ћелије, односно њене масе. Временски G_1 фаза може трајати 1 до 2 сата, и потпуности је зависна од присуства фактора раста (189). За S фазу ћелијског циклуса је специфично да се дешава репликација *ДНК* молекула, стога од диплоидне ($2n$) настаје тетраплоидна ћелија ($4n$). Временски S фаза ћелијског циклуса може трајати од неколико минута до неколико сати (189, 190). Наставак S фазе је G_2 фаза, карактеристика за ову фазу ћелијског циклуса је то да није неопходна посебна стимулација (189, 191). Последња M фаза је место где долази до поделе једра и цитосола тако да долази до формирања две „ћерке“ ћелије (189). Свака новонастала ћелија има хаплоидан број хромозома и једнак део цитоплазме.

Како би се ћелијски циклус одиграо неопходна је строга контрола активираних процеса од стране многобројних фактора чији се рецептори налазе на плазма мембрани. Улога фактора контроле ћелијског циклуса може ићи у смеру активације или инхибиције деобе ћелије. У физиолошким условима ћелијска пролиферација се стимулише везивањем фактора раста за одговарајући рецептор који је локализован на ћелијској мембрани. Након везивања одговарајућег лиганда за рецептор на плазма мембрани долази до преноса сигнала од мембране у унутрашњост ћелије. Активирањем секундарних гласника сигнал се преноси до једра, где долази до преписивања *ДНК*

молекула. Такође, неопходна је прецизна контрола ћелијског циклуса на нивоу једра, а све у циљу правилне активације гена који су неопходни за ћелијску пролиферацију (нпр. гени који кодирају циклине) (192,193).

Постоје две кључне тачке у контроли одигравања ћелијског циклуса, прелазак из G_1 у S фазу ћелијског циклуса у којем есенцијалну улогу имају протеини једра као што је *retinoblastoma protein*, *Rb*, док другу кључна тачка је прелазак из G_2 у M фазу ћелијског циклуса где најбитнију улогу има комплекс који је означен као фактор промоције матурације, *MPF* (енг. *maturation promoting factor*, *MPF*) (193).

1.8.1. G_1/S фаза ћелијског циклуса

Осим што долази до увећања масе ћелија, када говоримо о G_1 фази треба истаћи да долази и до појачане синтезе градивних беланчевина као и ензима. Како G_1 ћелијска фаза одмиче до повећане синтезе циклина D , прецизније повећана је синтеза три врсте циклина $D1$, $D2$, $D3$. Претходно поменути циклини имају могућност везивања за *Cdk4/Cdk6*, који у физиолошким условима фосфорилише протеин ретинобластом (*pRb*). Уколико је протеин ретинобластом у хипофосфорилисаној форми биће чврсто везан за транскрипциони фактор *E2F-1*, а у таквој везаној форми *E2F-1* је инхибиран. Уколико дође до фосфорилације протеина *pRb* доћи ће до отпуштања *E2F-1* транскрипционг фактора. Фактор *E2F-1* има есенцијалну улогу у активацији циљних гена, циклина а све у циљу одигравања процеса репликације *ДНК* молекула (194-196).

Процес репликације се одиграва у следећој S фази за коју је карактеристично дуплирање генетичког материјала. Постоји извесна осетљивост G_1 фазе ћелијског циклуса на дејство физичких и хемијских фактора као и на повећану продукцију реактивних кисеоничних врста. Уколико дође до оштећења ћелије, есенцијалну улогу у заустављању ћелијског циклуса преузима *p53*. Затим, у серији реакција, комплекси циклина и циклин зависних киназа се инхибирају, чиме се потпуно зауставља даља прогресија ћелијског циклуса. Ово заустављање ћелијског циклуса има за циљ да активира ензиме за поправку *ДНК* молекула, чиме би се након завршетка процеса поправке ћелијски циклус могао наставити. Иреверзибилно оштећење ћелијскох структура резултује активацијом процеса програмиране ћелијске смрти (197-199).

1.8.2. G_2/M фаза ћелијског циклуса

Пре него што уђе у процес митозе неопходно је да ћелија прође кроз G_2 фазу ћелијског циклуса. Основа ове фазе ћелијског циклуса је дуплирање хромозома као и других ћелијских структура, а све у циљу формирања две нове ћелије. Од есенцијалног значаја за прогресију ове фазе је конекција између циклина A и *Cdk2*, циклина A и *Cdk1* као и циклина B и *Cdk1*. Ове конекције као последицу имају синтезу бројних молекула који стварају митотско вретено и омогућавају да се процес митозе одигра. Како би дошло до коначне поделе ћелије и финализације процеса митозе неопходно је формирање комплекса *APC* (енг. *Anaphase-promoting complex*). Приликом оштећења ћелије у G_2/M

фази, долази до застоја у циљу поправке новонасталих оштећења. Кад говоримо о инверзибилним оштећењима, доћи ће до појачане синтезе молекула који активирају процес програмиране ћелијске смрти (200, 201).

Можемо јасно закључити да ћелијски циклус је строго контролисан веома сложен процес, чији поремећај може довести до малигне трансформације ћелија. Стога јасно је да неконтролисан ћелијски циклус има веома битну улогу у процесу канцерогенезе и да регулаторни молекули могу послужити као потенцијалне мете за модерну и ефективну антитуморску терапију (197-201).

1.9. СКВАМОЦЕЛУЛАРНИ КАРЦИНОМ

Карцином сквамозних ћелија (SCC) усне дупље је преовлађујући облик оралног карцинома, који чини отприлике 90% свих оралних малигнитета. Ова врста рака потиче од сквамозних ћелија, које формирају облогу оралне слузокоже која обухвата регионе као што су усне, језик, десни и унутрашњи образи (202).

Различити фактори доприносе повећаном ризику од развоја оралног сквамозног карцинома. То укључује навике као што су пушење или жвакање дувана, прекомерна конзумација алкохола, жвакање бетел ораха, лоша орална хигијена, хронична иритација услед лоше прилагођене зубне протетике, инфекција хуманим папилома вирусом (HPV) и продужено излагање ултраљубичастом (UV) зрачењу, посебно у вези са карциноми усана (202-207).

Манифестација оралног сквамозног карцинома често се манифестује уочљивим симптомима, укључујући упорне чиреве у устима или квржице које не зарастају, сталну нелагодност или бол у устима, проблеме при гутању или жвакању, хроничну упалу грла, промене у квалитету гласа, утрнулост у оралним или устима. региона, и оток у вилици.

Дијагноза оралног сквамозног карцинома обично укључује свеобухватну процену усне дупље и грла, често допуњену модалитетима снимања као што су рендгенски снимци, СТ скенирање или MR скенирање. Међутим, коначна потврда захтева процедуру биопсије, при чему се вади мали узорак ткива за микроскопски преглед.

Стратегије лечења оралног сквамозног карцинома обухватају спектар модалитета, прилагођених стадијуму и локацији рака. То може укључивати хируршку ексцизију, терапију зрачењем, хемотерапију, циљану терапију или њихову комбинацију, са примарним циљем искорењивања малигних ћелија уз очување функционалних и естетских аспеката што је више могуће (206, 207).

Прогноза оралног карцинома сквамозних ћелија зависи од неколико фактора, укључујући стадијум рака, локализацију, опште здравствено стање пацијента и одговор на лечење. Рано откривање и брза интервенција значајно побољшавају прогнозу и исходе лечења.

Превентивне мере играју кључну улогу у ублажавању ризика од оралног сквамозног карцинома. Прихватање навика као што су престанак пушења, умереност у конзумирању алкохола, пажљива орална хигијена, заштита усана од прекомерног излагања сунцу и вакцинација против HPV-а су кључне превентивне стратегије.

Штавише, пажљиво праћење након третмана путем редовних контролних прегледа остаје императив да би се открили знаци рецидива или потенцијалних компликација. Често се заговарају модификације начина живота као што су престанак пушења и умереност алкохола како би се смањило ризик од поновног појављивања рака и побољшало опште благостање (202, 206, 207).

1.10. КАРЦИНОМ ЈЕЗИКА

Од свих малигних неоплазми усне дупље, сквамoцелуларни карцином је најчешће дијагностиковани хистолошки тип. Према доступним подацима само у 2018. години је дијагностиковано 354,864 нових случајева у свету, а више од половине пацијената су чинили мушкарци. Исте године број смртних случајева код пацијената са дијагностикованим карциномом језика је износио 177,384, а две трећине од укупног броја оболелих су чинили мушкарци (202).

Посебно је забрињавајућа чињеница да у последњих десет година расте број младих пацијената, испод двадесет једне године, код којих је дијагностикован сквамoцелуларни карцином језика. Етиолошки фактори за настајање карцинома језика код млађих особа нису разјашњени, врло често се могу елиминисати фактори као што су пушење и алкохол. Код млађих пацијената неки генетички синдроми могу условити настанак малигне неоплазме језика, као и инфекција хуманим папилома вирусом. Код старијих пацијената узрок може бити хронична инфламација језика, пушење као и повећано конзумирање алкохолног пића. Такође у факторе ризика за настанак карцинома језика убрајамо старост, лошу оралану хигијену као и ослабљен имунитет.

Као и код свих неоплазми уколико се сквамoцелуларни карцином језика дијагностикује у раној фази постоји добар одговор на терапију и могућност потпуног излечења. Ипак у раној фази карцинома језика дијагноза је спроведена у свега 40% случајева од укупног броја оболелих. Када се сквамoцелуларни карцином дијагностикује у узнaпредовалој фази петогодишње преживљавање варира између 30 до 50% (202-205).

У почетној фази сквамoцелуларног карцинома језика симптоми могу изостати. Могуће је откривање карцинома од стране зубара или доктора приликом рутинског прегледа усне дупље. Најчешће је пристуно црвенило и улцерација која се не повлачи. Други рани симптоми могу укључивати бол, крварење у усној дупљи и задебљање површине језика. У узнaпредовалој фази када дође до ширења карцинома могуће је искашљавање крви, бол у уху као и губитак тежине. Остали симптоми укључују беличасте и црвене промене на језику, бол у грлу, покрети језика су ограничени и долази до девијације језика ка малигну измењеној страни. Такође, веома често услед секундарне инфекције језик је отечен при чему могу да се јаве и проблеми са говором и гутањем. Око 70% пацијаната у тренутку дијагнозе има увећане регионалне лимфне жлезде. Сквамoцелуларни карцином језика веома брзо метастазира у околне лимфне чворове, тако да увећање жлезда може бити често први разлог јављања лекару (202-205).

Дијагноза сквамoцелуларног карцинома језика се може поставити уз помоћ клиничке слике, биопсије и патохистолошког налаза (202-205).

Терапија зависи од стадијума узнaпредовалости тумора као и од дела језика који је захваћен малигнитетом. Уколико је тумор мањи од 4 cm и локализован је само у језику терапијска мера се састоји у хирушком уклањању малигнитета. Такође, након хирушког

уклањања препоручена је радиотерапија у циљу превенције поновног јављања малигнитета. У извесним случајевима у раној фази карцинома могућа је примена радиотерапије без хирушке интервенције. Уколико је у тренутку дијагнозе карцином у узнатредовалој фази, величине преко 4 cm спроводи се хирушко уклањање тумора и захваћених лимфних чворова, радиотерапија, хемиотерапија, комбинација хемиотерапије и радиотерапије (206, 207).

Агресивна хемиотерапија се примењује уколико постоји висок ризик након хирушке терапије од поновног јављања малигнитета, уколико је карцином метастазирао у локална ткива и удаљене органе. Најчешће примењивани хемиотерапеутици су цисплатина и 5-флуороурацил. Такође, поред цисплатине као алтернатива може се користити карбоплатин (207, 208).

Нежељени ефекти хемиотерапије укључују појаву честих инфекција као и резистенцију малигнитета на примењени хемиотерапеутици (207).

1.11. АНТИТУМОРСКИ ЛЕКОВИ

Већина савремене антитуморске терапије се знасива на спречавању процеса ћелијске деобе канцерских ћелија, прецизније остварују антипролиферативни ефекат. Прецизније, већина антитуморских лекова остварује свој ефекат инхибицијом ћелијске деобе током *S* фазе ћелијског циклуса, чиме се узрокује оштећење *ДНК* молекула и активира процес програмиране ћелијске смрти (2, 4). Антиканцерски лекови су на основу самог механизма антитуморског дејства подељени у неколико категорија

1. *Алкилирајући агенси и сличне супстанце*, након уласка у малигно измењену ћелију настоје да формирају чврсту везу са *ДНК* чиме потпуно прекидају репликациони процес.
2. *Антиметаболити*, након уласка у канцерску ћелију антитуморски ефекат остварују инхибицијом метаболичких путева који су есенцијални за стварање *ДНК*.
3. *Цитотоксични антибиотици*, молекули синтетисани од стране микроорганизама ефективно спречавају пролиферацију туморских ћелија.
4. *Деривати биљака* (винка алкалоиди, таксани, кампотецини), након уласка у туморску ћелију спречавају синтезу деобног вретена.
5. *Хормони* (естрогени, андрогени, гликокортикоиди).
6. *Остали агенси*, антиканцерски лекови који не припадају ниједној горе наведеној групи (2).

Алкилирајући агенси хемијски су састављени из реактивних алкил група при чему се могу везати за ћелијске структуре, посебно за молекул *ДНК* малигно измењене ћелије. Прецизније главна „мета“ алкилирајућих агенаса је *N7*, нуклеофилна компонента *ДНК* молекула. Као резултат оваквог деловања долази до иреверзибилног оштећења молекула *ДНК* при чему ће се активирати унутрашњи апоптотски пут. Прецизније, иреверзибилно се инхибирају процеси транслације и транскрипције који су есенцијални у процесу пролиферације малигнућих ћелија. Можемо закључити да алкилирајући агенси свој антитуморски ефекат остварују инхибицијом *S* и *G₂* фазе. Ова група антиканцерских лекова има многобројне нежељене ефекте, као што су мијелосупресија и могућност настанка различитих форми леукемије (2, 4).

Најчешће коришћени лек из групе антиметаболита је метотрексат. Применом метотрексата долази до инхибиције синтезе тимидина, чиме се спречава синтеза *ДНК* молекула канцерске ћелије. Метотрексат у малигно измењене ћелије улази активним транспортом који је намењен за фолате. Услед дуготрајне терапијске примене може се јавити резистенција, такође присутни су и нежељени ефекти као што су депресија костне сржи и оштећење малигно неизмњених ћелија гастроинтестиналног тракта (2, 4).

Цитотоксични антибиотици свој антитуморски ефекат испољавају инхибицијом синтезе *ДНК* и *РНК* канцерске ћелије. Прецизније, иреверзибилно инхибирају ензим *топоизомеразу II*. Нежељена дејства могу бити мучнина, повраћање, мијелосупресија (2).

Деривати биљака свој антитуморски ефекат остварују на више начина. Винкрестин, након уласка у канцерску ћелију доводи до инхибиције процеса митозе у метафази везивањем за тубулин. Са друге стране, етопозид свој ефекат остварује

инхибицијом *топоизомеразе II*. Нежељени ефекти ове групе лекова могу бити мијелосупресија, алопеција, повраћање (2).

У циљу што ефикасније антитуморске терапије против хормон-зависних тумора корсите се антагонисти хормона. Тамоксифен је показао снажан антитуморски ефекат код хормон зависних тумора дојке. Футамид ципротерон су показали велику ефикасност у терапији тумора простате (2,4).

Недостаци антитуморске терапије се односе на неселктивност, резистенцију немогућност комплетне елиминације малигнух ћелија. Лекови који се примењују у антиканцерској терапији делују неспецифично, односно неселктивно, чиме долази до оштећења и малигну неизмењених ћелија. Малигне ћелије могу развити резистенцију према антитуморским лековима, примарну која је се јавља код прве дозе лека или стечену која се јавља током дуготрајне примене лека. Код примене терапијских доза хемиотерапеутика није могућа комплетна елиминација канцерских ћелија (2, 4, 209).

Свремена истраживања теже ка развоју нових хемиотерапеутика, чиме ће се превазићи проблем резистенције, показати одређен степен селективног деловања и појачати имунски одговор на малигнитете.

1.12. КОМПЛЕКСИ МЕТАЛА У АНТИТУМОРСКОЈ ТЕРАПИЈИ

Биолошки ефекат металних комплекса је откривен још у античком периоду (210). Генерално, метали су присутни у ћелијама, улазе у састав састав ензима и учествују као есенцијалне компоненте у различитим биолошким процесима. Метали као што су бакар, цинк, магнезијум, неопходни су као структурне и каталитичке ензимске компоненте (211). Са друге стране, неки метали као што су никл, кадмијум, хром и арсен могу утицати на развој канцерогенезе (212). Биолошки активни комплекси који као есенцијалну компоненту имају метал прелазне валенце доказали су се као веома добри потенцијални хемиотерапеутици (210, 213). Са открићем биолошке активности цисплатине од стране Розенберга 1960. године, лека који се и данас користи у антитуморској терапији, почела су даља истраживања која се базирају на синтези различитих металних комплекса. Платина (II) комплекси као што су оксалиплатин и карбоплатин имају терапијску примену у лечењу различитих малигнитета (214-216). Са друге стране метални комплекси који не садрже платину, већ цинк, рутенијум, злато, бакар, паладијум су показали снажно антитуморско дејство *in vitro* (217-219). Сматра се да сви претходно поменути комплексни могу имати велики антитуморски потенцијал због самих особина метала, као што су редокс активност и потенцијално везивање за различите ћелијске структуре (210, 175). Такође, замена лиганда и постојећих хемијских структура комплекса омогућава синтезу широког спектра једињења на бази различитих метала. Од есенцијалног је значаја и проучавање транспорта потенцијалног хемиотерапеутика, металног комплекса, до канцерске ћелије, као и начин уласка у малигно измењену ћелију.

Велики број комплекса платине је синтетисан и ова једињења су показала значајан антитуморски ефекат на великом броју ћелијских линија *in vitro* (220, 221). Оваква тестирања су била могућа услед коњугације металне компоненте, платине са лигандима различите хемијске структуре. Коњугацијом комплекса платине са угљеним хидратима дошло је до значајних физичко-хемијских промена, што је условило повећање солубилности комплекса платине као и олакшано преузимање од стране канцерских ћелија. На пример, комплекс платине [$PtII Cl_2(AcGlc-pyta)$] висок степен цитотоксичне активности на *HeLa* ћелијској линији (215).

У циљу превазилажења нежељених ефеката цисплатине, синтетисан је велики број рутенијум(II) рутенијум (III) комплекса. Због својих хемијских особина рутенијум комплекси се могу узети за већи број лиганда у односу на комплексе платине. Посебно је значајна особина рутенијум (III) комплекса да се на исти начин као и гвожђе везују за серумске протеине чиме се веома ефективно допремају до малигно измењених ћелија. Канцерске ћелије имају различити метаболизам у односу на малигно неизмењене ћелије и експримирају велики број трансферинских рецептора, што је такође веома битно при преузимању комплекса рутенијума. Осим трансферин зависног механизма, рутенијум комплекси улазе у туморску ћелију и пасивном дифузијом. Веома битан корак који се дешава унутар малигно измењене ћелије је редукција $Ru(III)$ у $Ru(II)$, при чему се рутенијум може узети за ДНК канцерске ћелије и смањити вијабилност индукцијом апоптозе. Ова чињеница је искоришћена за синтезу $Ru(II)$ комплекса који су такође демонстрирали значајан антитуморски ефекат на великом броју ћелијских линија *in vitro* (175, 222, 223).

Комплекси бабра показују снажан цитотоксични ефекат, али са молекуларним механизмом који се разликује од антитуморског механизма комплекса платине. Активност комплекса бабра варира у зависности од врсте лиганата који су везани за металну компоненту. Потенцијални цитотоксични ефекти великог броја комплекса бабра су испитивани због хипотезе да ова једињења могу показати већу селективност од комплекса платине. Бакар је есенцијални елемент и саставна је компонентна различитих ензима, тако да је присуство бабра неопходно за развој максималне каталитичке активности. Приликом уласка комплекса бабра у малигно измењену ћелију долази до смањене активности ензима *SOD*, услед чега долази до хиперпродукције реактивних кисеоничних врста и последичног оштећења ћелије. Комплекси бабра су демонстрирали значајан антипролиферативни ефекат на великом броју ћелијских линија индукујући процес програмиране ћелијске смрти (224, 225).

Синтетисан је велики број комплекса злата, а све у циљу проналажења потенцијалног хемиотерапеутика који ће превазићи недостатке комплекса платине. Прецизније, од великог значаја је могућност везивања комплекса злата за активно место различитих ензима, чиме се онемогућава каталитичка активност истих. Комплекси злата имају посебно велики афинитет везивања за тиол групе ензима који су есенцијални за функционисање ћелије, као што је на пример ензим тиоредоксин редуктаза (*TrxR*). Након везивања за ензиме индукују процес програмиране ћелијске смрти. Велики број синтетисаних *Au(III)* комплекса је показао снажан антитуморски ефекат на цисплатин резистентним ћелијским линијама *in vitro* (226, 227).

Комплекси сребра су одавно познати по свом антимикуробном ефекту и користе се у терапији инфицираних рана као и опекотина. Комплекси сребра су показали снажан цитотоксични ефекат на различите канцерске ћелије. Прецизније, синтетисани *Ag(I)* комплекси су показали снажнији цитотоксични ефекат у односу на цисплатину *in vitro* и значајно већи степен селективности (228, 229).

Паладијум комплекси су такође демонстрирали снажан антитуморски ефекат на малигно измењене ћелијске линије. Снажан антипролиферативни ефекат је показан и на цисплатин-резистентним туморима као и на хормон-зависним туморима. Посебно је значајна чињеница да су *Pd(II)* једињења показала слабо антипролиферативно дејство на малигно неизмењене ћелије. Поред тога, ова комплекси испољавају снажан антимикуробни ефекат (230, 231).

1.13. КОМПЛЕКСИ ПЛАТИНЕ И ЦИСПЛАТИНА

Први откривени хемиотерапеутик, који у својој структури има метал платину и користи се у терапији бројних типова канцера је цисплатина. Употреба цисплатине је од есенцијалног значаја када говоримо о лечењу великог броја малигнитета а у прилог томе нам говори чињеница да се чак 50% од укупно дијагностикованих пацијената лечи применом овог лека. Цисплатина је откривена 1845. године, али је биолошка активност јасно дефинисана од стране Розенберга касније, 1960. године. Прецизније, приликом испитивања цисплатине дошло се до сазнања да ово једињење инхибира пролиферацију малигно измењених ћелија (214-216). Затим је проучаван механизам антипролиферативног дејства цисплатине, при чему је откривено да ово једињење има могућност везивања за молекулу ДНК у једру као и митохондријску ДНК услед чега долази до активације процеса некрозе или програмиране ћелијске смрти. Хемијска структура цисплатине обухвата метал, платину везану за две NH_3 групе као и два атома Cl (2, 4, 214). Савремена терапијска процедура подразумева примену лека се интравенском инјекцијом или инфузијом. Након примене овог лека долази до везивања цисплатине за серумске протеине (албумин и трансферин), сматра се да 65–95% од укупне примењене терапијске концентрације цисплатине се везује протеине. Веома мали остатак цисплатине се транспортује унутар малигне ћелије пасивном дифузијом кроз плазма мембрану (слика 6) (214). Новија истраживања су показала у транспорту цисплатине приликом уласка у канцерску ћелију есенцијалну улогу има транспортни протеин *CTR1* (енг. *copper transporter protein*). Стога, малигно измењене ћелије које имају повећану експресију протеина *CTR1* показују већу сензитивност на овај лек (232).

Након уласка у ћелију дешава се замена хлорида воденим лиганацима, затим долази до везивања цисплатине за различите ћелијске структуре. Стварање повећане концентрације реактивних кисеоничних врста унутар малигно измењене ћелије је један од антипролиферативних механизма цисплатине. Прецизније, цисплатина индукује повећану продукцију хидроксилних радикала што условљава активацију процеса липидне пероксидације и оштећење ДНК молекула. Митохондрије унутар ћелије су такође погођене услед оксидативног стреса при чему долази до немогућности одвијања процеса оксидативне фосфорилације и ћелијске дисфункције. Сви ови процеси воде ка активирању унутрашњег пута програмиране ћелијске смрти (233, 234).

Цисплатина може индуковати процес апоптозе малигну ћелија преко плазма рецептора. Прецизније, долази до активације *Fas* рецептора и активације спољашњег апоптотског пута (235).

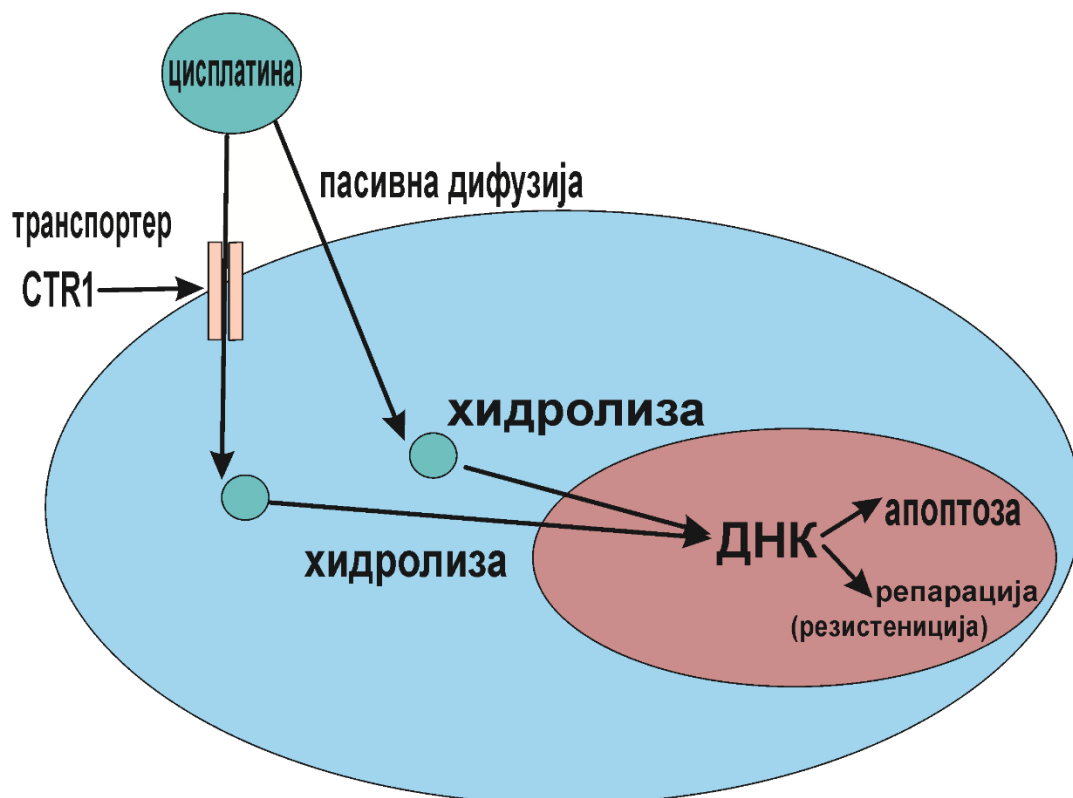
Приликом уласка у ћелију цисплатина може да се веже за ДНК молекулу, односно за N у положају 7, што заводи ка оштећењу ДНК и немогућности одвијања циклуса. Последица је да индукција застоја у G_1 , S и G_2 фази ћелијског циклуса уз инхибицију могућности репарације оштећења ДНК молекула чиме ће се активирати процес апоптозе. Цисплатина активира „*checkpoint*“ киназе *Chk1* и *Chk2* које су директно одговорне за застој у G и S фази ћелијског циклуса (2, 214, 236).

Велики проблем када говоримо о терапији цисплатином је развој туморске резистенције на лек, при чему резистенција зависи и од типа малигнитета (2, 4). На пример, карцином тестиса и оваријума показује велику сензитивност на примену цисплатине, док *non-small cell* карцином плућа и колоректални карцином показују велики степен резистенције на лек (214).

Постоји више описаних молекуларних механизма уз помоћ којих долази до развоја резистенције на цисплатину. Само присуство цисплатине унутар ћелије може условити деградацију и пад концентрације *Ctrl* протеина (који има улогу у преносу цисплатине) при чему долази до немогућности уласка лека. Такође, транспортери *ATP7A* и *ATP7B* имају улогу у елиминацији цисплатине, при чему долази до изласка цисплатине у екстрацелуларни простор. Затим, један од главних молекуларних механизма инактивације цисплатине, који се одиграва у самој ћелији подразумева могућност везивања цисплатине за глутатион. Овако везан комплекс може се елиминисати и експортирати ван малигне ћелије. Најбољи начин елиминације *ДНК* лезија које услављава цисплатина је путем *NER*-а (енг. *nucleotide excision repair*). Услед могућности репарације *ДНК* молекула, малигне ћелије које имају повећану експресију *NER*-а су резистентне на терапијски ефекат цисплатине (214, 237).

Многобројни нежељени ефекти цисплатине обухватају нефротоксичност, ототоксичност, хепатотоксичност, оштећење гастроинтестиналног тракта, поремећаји вида. Посебан проблем приликом примене цисплатине представља неселективност при чему долази до оштећења малигно неизмењених ћелије активацијом програмиране ћелијске смрти (2, 214).

Из претходно наведених разлога новија истраживања се фокусирају на синтезу нових једињења која у својој структури садрже металну компоненту (платина, рутенијум, злато, сребро) а која би потенцијално могла да превазиђу недостатке који се јављају приликом примене цисплатине.



Слика 6. Улазак цисплатине у малигно измењену ћелију

1.14. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА

Паладијум је метал VIIIБ групе откривен 1803. године, при чему су такође детаљно објашњене хемијске особине овог елемента. Овај хемијски елемент се користи и у медицинске сврхе посебно у зубној медицини. Оксидациона стања паладијума су 0, +1, +2 и +4 (238).

Новија истраживања обухватају синтезу великог броја паладијум комплекса, а све у циљу детаљног проучавања механизма антипролиферативне активности. Једињења која садрже паладијум су показала веома снажан антипролиферативно дејство на велики број канцерских ћелијских линија *in vitro* (239).

Истраживање публиковано од стране *Juribasic* и сарадника је демонстрирало да синтетисани *Pd(II)* показују значајан антипролиферативни ефекат на велики број малигнућ ћелијских линија хуманог порекла *SW 620*, *H 460*, *MCF-7*, *HCT 116*, *MOLT-4*. Прецизније, синтетисани *Pd(II)* комплекси су показали снажнији цитотоксични ефекат на *SW 620* и *MCF-7* ћелијске линије у односу на контролни лек, цисплатину. Такође, показана је и снажна антимикуробна активност *Pd(II)* једињења (240). Затим, истраживање *Simic* и сарадника је показало да пет синтетисаних *Pd(II)* комплекса демонстрирају јако антипролиферативно дејство на ћелије хуманог порекла карцинома простате *PC-3* и *DU-145*. Одговарајући лиганди испољили су веома слабо антипролиферативно дејство на *PC-3* и *DU-145* ћелије, чиме је показано да без присуства металне компоненте, у овом случају паладијума није могуће остварити снажан антипролиферативни ефекат. Такође, антипролиферативни ефекат пет синтетисаних једињења на малигнућ неизмењене фибробласте је био веома слаб, чиме је јасно демонстрирана селективност *Pd(II)* комплекса (239). Два синтетисана *Pd(II)* комплекса од стране *Pruchnik* и сарадника су показала умерен антипролиферативни ефекат на ћелијске линије малигног меланома *SH-4*, *Colo-829*, *C-32* и ћелијске линије карцинома дојке *MCF7*, *T-47D* и *MDA-MB-231* (241). Осам синтетисаних *Pd(II)* једињења од стране *Li* и сарадника демонстрирала су снажну антитуморску активност на *MCF-7*, *HeLa*, и *A549* малигне ћелије (242). Научно истраживање *Joksimovic* и сарадника је демонстрирало висок степен селективности *Pd(II)* једињења, при чему су синтетисани комплекси испољили снажно антипролиферативно дејство на *MDA-MB-231* и *HeLa* ћелијској линији, а веома слаб антипролиферативни ефекат је показан на контролној ћелијској популацији, фибробластима (243).

На основу претходно поменутих истраживања можемо закључити да *Pd(II)* једињења демонстрирају антипролиферативни ефекат на различите ћелијске линије, при чему неки од поменутих комплекса показују и висок степен селективности.

Механизам антипролиферативног дејства *Pd(II)* комплекса подразумева индукцију процеса апоптозе. *Simic* и сарадници су у својој студији јасно показали да синтетисана *Pd(II)* једињења инукују процес ране апоптозе *PC-3* и *DU-145* ћелија. Прецизније, долази до покретања митохондријалног пута програмиране ћелијске смрти при чему долази до повећане синтезе проапоптотских протеина и активације каспазе-3 (239). *Zhang* и сарадници су показали да комплекси паладијума испољавају снажно антипролиферативно дејство индукцијом унутрашњег митохондријалног пута, при чему долази до смањења експресије *Bcl-2* протеина и повећане концентрације проапоптотског

Bid протеина (244). *Li* и сарадници су у својој студији дефинисали да применом *Pd(II)* се повећава концентрација реактивних кисеоничних врста, што ће условити оштећење митохондрија и активирати унутрашњи апоптотски митохондријални пут (242). Затим, *Espino* и сарадници су јасно показали да паладијум једињења умањују вијабилност малигнућ ћелија активацијом процеса апоптозе (245). Осим активације процеса апоптозе, студије показују да бројни синтетисани *Pd(II)* комплекси могу зауставити ћелијски циклус у различитим фазама, што за последицу има немогућност пролиферације малигнућ ћелија (239).

Сва наведена истраживања нам јасно указују да комплекси паладијума демонстрирају снажно антитуморско дејство индукцијом апоптотичног процеса или заустављањем ћелијског циклуса. Имајући у виду претходно наведене чињенице, наша студија је тестирала два новосинтетисана комплекса паладијума, обележена као *Pd1* и *Pd2*, на ћелије сквамозелуларног карцинома језика, а у циљу демонстрирања степена селективности *Pd(II)* једињења, као контролну ћелијску линију користили смо фибробласте.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

Циљеви наше студије су:

1. Дефинисање потенцијалног антипролиферативног дејства комплекса паладијума:
 - *Pd1* - $([\text{Pd}(\text{diem})]_2(\mu\text{-pz}))(\text{ClO}_4)_4$ и
 - *Pd2* - $([\text{Pd}(\text{diem})]_2(\mu\text{-pydz}))(\text{ClO}_4)_4$на ћелијске линије:
 - *SCC-4* – сквамоцелуларни карцином језика и
 - *MRC-5* – контролна линија, фибробласти.
2. Дефинисати однос некротичне и апоптотске смрти канцерских ћелија индуковане од стране тестираних комплекса.
3. Дефинисати да ли испитивани комплекси утичу на одвијање ћелијског циклуса тестираних ћелија
4. Одредити утицај тестираних комплекса на релативни однос проапоптотичног протеина *bax* и антиапоптотичног *bcl-2* протеина.
5. Одредити ефекат испитиваних супстанци на активацију *bax*-а и каспазе-3.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

Радне хипотезе истраживања су:

1. Комплекси *Pd1* и *Pd2* имају снажан антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије, а демонстрирају слабији антипролиферативни ефекат на здраве фибробласте.
2. Тестирани комплекси заустављају ћелијски циклус канцерских ћелија и тиме смањују брзину њихове пролиферације.
3. Свој антипролиферативни ефекат тестирани комплекси индукују покретањем апоптозе, при чему долази до повећања релативног односа *bax/bcl-2*, и активира се каспаза-3.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ

Истраживање је конципирано и спроведено као експериментална студија *in vitro*. У нашем истраживању користили смо ћелијске линије хуманог порекла.

3.2. ИСПИТИВАНЕ ЋЕЛИЈЕ

Испитиване популације ћелија, односно ћелијске линије које смо користили у нашем истраживању су следеће:

Ћелијска линија *SCC-4* (*CRL-1624*TM, <https://www.atcc.org/products/crl-1624>), епителне ћелије, изоловане из језика 55 годишњег мушког пацијента са сквамозелуларним карциномом језика.

Ћелије *MRC-5* (*CCL-171*TM, <https://www.atcc.org/products/ccl-171>) су малигно неизмењене ћелије хуманих фибробласта.

Ћелије линије *MRC-5* смо добили захваљујући љубазности проф. др Петра Чановића са Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Ћелијске линије хуманог порекла *SCC-4* и *MRC-5* смо одржавали и култивисали на исти начин. Одмрзнуте су криовајлице запремине 2 mL, мешањем у топлој води у временском периоду краћем од 2 минута. Након процедуре одмрзавања, течни садржај је премештен у стерилне епрувете, где се налазио комплетан медијум. Следећи корак је обухватао центрифугирање десет минута на 1000 обртаја/мин, затим супернатант је извучен из епрувета. Целокупни садржај епрувета је премештен у стерилне флашкове намењене за одржавање ћелијских култура запремине 25 cm³. Такође, флашкови са ћелијским културама су смештени у инкубатор у коме је присутна апсолутна влажност и 5% CO₂. Култивација ћелија се одиграла на температури 37°C.

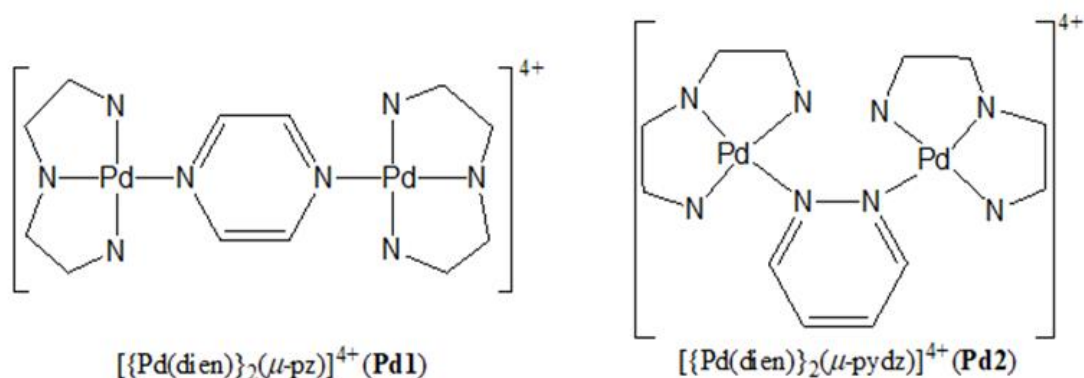
Ћелијске линије које смо користили у нашем истраживању смо одржавали у комплетном медијуму за ћелијске културе који смо припремали у складу са инструкцијама произвођача (*ATCC, American Type Culture Collection*) и то на следећи начин:

- 10% запремине је чинио топлотом инактивисани говећи серум (*FBS, fetal bovine serum, Sigma, Catalog Number: F7524, https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/product/sigma/f7524?gclid=CjwKCAjwiuuRBhBvEiwAFXKaNF0dAvt2CAYCISfK23VILHOseq24AjWBGHvsTe3WpuADuB2LIPZ0kBoCSHYQAvD_BwE*)
- 1% - додаване су неесенцијалне аминокиселине (*NEAA - Non-Essential Amino Acid Cell Culture Supplement, GibcoTM Catalog number. 11140050, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11140050>*)
- 89% запремине је чинио основни медијум за ћелијске културе и то *DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)* са високом концентрацијом глукозе и L-глутамином (*Capricorn Scientific, Catalog number: p1126, <https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/dmem-high-glucose-4-5-g-l-with-l-glutamine~p1126>*)

Расејавање ћелијских култура је вршено када је конфлуентности флашка износила 90%. Експериментални део нашег истраживања је вршен искључиво у фази експоненцијалног раста испитиваних ћелијских култура. Такође, експерименти су извођени у три узаступна понављања, а све у циљу добијања валидних резултата. Реагенси коришћени у нашој студији су добијени од стране Сигме (*Sigma, Germany*).

3.3. ТЕСТИРАНИ КОМПЛЕКСИ

Паладијум(II) једињења су синтетисана на Природно-математичком факултету од стране истраживачког тима проф. др Марије Живковић. Синтетисана су два паладијум(II) комплекса хемијске формуле $[\text{Pd}(\text{dien})_2(\mu\text{-pz})](\text{ClO}_4)_4$ и $[\text{Pd}(\text{dien})_2(\mu\text{-pydz})](\text{ClO}_4)_4$. Тестирана једињења су синтетисана и окарактерисана елементарном микроанализом и инфрацрвеном и *NMR* спектралном анализом. Синтетисане комплексе паладијума смо обележили као *Pd1*- $[\text{Pd}(\text{dien})_2(\mu\text{-pz})](\text{ClO}_4)_4$ и *Pd2*- $[\text{Pd}(\text{dien})_2(\mu\text{-pydz})](\text{ClO}_4)_4$.



Слика 7. Структурне формуле *Pd1* и *Pd2* комплекса

Након што је јасно дефинисана структура *Pd1* и *Pd2* комплекса и одговарајућих лиганата, добијено је по 20 mg тестираних једињења. Количина од 20 mg је била довољна за испитивање антипролиферативног ефекта на ћелијске културе *SCC-4* и *MRC-5 in vitro*. Синтетисана једињења паладијума су добро растворљива у диметилсулфоксиду (*DMSO, dimethylsulfoxide*), а нису растворљиви у води. Комплекси паладијума су у експерименталне сврхе растварани у диметилсулфоксиду, али концентрација диметилсулфоксида у финалном раствору није прелазила 0,05% v/v. Једињења *Pd1* и *Pd2* су увек растварана непосредно пре експерименталног рада, а све у циљу очувања структуре самих комплекса. Претходно је стабилност комплекса после три временска интервала након растварања у диметилсулфоксиду потврђена посматрањем и снимањем *UV-Vis* спектра, што је забележено *Perkin-Elmer Lambda 35* спектрометром.

3.4. ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА

Независне варијабле студије (узрок) представљаће примењени комплекси паладијума, а зависне варијабле (исход), представљаће измерене вредности параметара вијабилности и апоптозе туморских ћелија. Испитивање се вршило у лабораторијама Института факултета медицинских наука у Крагујевцу.

3.5. МТТ ТЕСТ

Извођење МТТ теста након третмана ћелија испитиваним једињењима је есенцијано у утврђивању степена вијабилности ћелија.

МТТ јасно дефинише стопу преживљавања ћелија као и метаболичку активност истих. Овим тестом можемо јасно детектовати различит степен активности ензима *NAD(P)H*-зависне оксидоредуктазе чија је локализација у живим ћелијама. Стога, што је степен активности *NAD(P)H*-зависне оксидоредуктазе већи то нам јасно указује да је већи број живих ћелија. Ради добијања прецизних и валидних резултата неопходна је и контролна популација ћелија која није изложена испитиваним једињењима, већ је култивисана само у медијуму. Активношћу *NAD(P)H*-зависна оксидоредуктазе долази до редукције жутог раствора тетразолијум-бромида у формазан, који је љубичасте боје. Стога, јасно је да љубичасти раствор након извођења МТТ теста садржи велики број живих ћелија, ћелије су вијабилне.

Степен вијабилности тестианих ћелијских линија *SCC-4* и *MRC-5* је испитиван у три временска интервала (24, 48 и 72 h) са различитим концентрацијама испитиваних једињења *Pd1* и *Pd2*. Концентрације испитиваних комплекса паладијума су износиле од $0,1\mu M$ до $100\mu M$.

Осим комплекса паладијума, на идентичан начин смо испитивали антипролиферативни ефекат цисплатине, као референтног лека. Стога, цисплатина је коришћена као позитивна контрола у нашој студији. Такође, услед своје клиничке примене тестиран је цитотоксични ефекат цисплатине и оксалиплатине.

Услед подизања ћелија из фласкова, једнак број ћелија око 5000 засејан је у појединачне бунаре микротитар плоча од 96 бунара. Веома је битно да су засејане ћелије заправо биле у експоненцијалној фази раста. У следећем кораку, испитивани ћелијске линије су третиране растућом концентрацијом *Pd1* и *Pd2* једињења. Свака концентрација је испитивана у триплекату, такође у три понављања. Сам третман испитиваним једињењима је износио 24, 48 или 72 сата, након чега се додаје 10%-ни раствор тетразолијум-бромида у *PBS*-у од $0,5mg/ml$. После два сата инкубације додавало се по $200\mu L$ *DMSO*-а у сваки бунар. Седећи корак подразумева лагано мешање плоча све у циљу растварања кристала формазана у *DMSO*-у. На крају, апсорбанца се читавала на *ELISA*-читачу на 595 nm .

Након тога смо рачунали стопу преживљавања ћелија по следећој формули:

$$V=(ABSt-Blank)*100/(ABSk-Blank),$$

Где је V -стопа преживљавања ћелија, $ABSt$ и $ABSk$ - апсорбанце третираних (t) и контролних (k), нетретираних ћелија, $Blank$ -вредност апсорбанце микротитар плоче, односно бунара у којима нема ни ћелија ни медијума.

Вредност цитотоксичности смо рачунали по формули:

$$C=100\%-V,$$

Где је C -цитотоксичност, а V -стопа преживљавања ћелија.

Након добијених резултата, приступило се израчунавању IC_{50} вредности. Ова вредност представља вредност половине максималне инхибиторне моларне концентрације. Прецизније, рачунали смо линеарну или логаритамску регресију уз помоћ програма *Microsoft Office Excel*-а 2021.

3.6. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕЛАТИВНОГ ОДНОСА ЋЕЛИЈА КОЈЕ СЕ НАЛАЗЕ У АПОПТОЗИ И НЕКРОЗИ (Annexin V/PI тест)

Након што је јасно дефинисан биолошки ефекат једињења паладијума на вијабилност испитиваних ћелијских линија, наредни корак у нашој студији је подразумевао јасно дефинисање механизма деловања синтетисаних једињења. Стога смо урадили серију експеримената у циљу тестирања деловања $Pd1$ и $Pd2$ једињења на релативни однос ћелија у апоптози и некрози. Користили смо *Annexin V/PI* тест, а однос је мерен проточном цитометријом.

Тестиране ћелије су биле *SCC-4*, малигне ћелије сквамозелуларног карцинома језика.

Принцип *Annexin V/PI* теста је заснован на бојењу ћелија које су претходно третиране IC_{50} концентрацијама испитиваних једињења $Pd1$ и $Pd2$. Услед третирања ћелија израчунатим IC_{50} вредностима, можемо закључити да ће само половина од укупног броја испитиваних ћелија бити вијабилна. Ћелије које су услед цитотоксичног ефеката комплекса паладијума активирале процес апоптозе имају карактеристику да остаци фосфатидил-серина (компоненте ћелијске мембране) су окренути ка спољашњој средини. За фосфатидил-серина се чврсто везује *Annexin V*. Ова чињеница нам јасно указује да су ћелије које се налазе у различитим фазама апоптозе анексин позитивне. За молекулу анексин је чврсто везана флуоресцентна боја која емитује флуоресценцију у спектру зелене боје, флуоресцеин-изотиоцијанат (*FITC*). Све ово нам омогућава да проточном цитометријом детектујемо јасно анексин позитивне ћелије. Пропидијум-јодид (*PI*) има могућност везивања за третиране ћелије, а само везивање за једру прави разлику између пропидијум-јодид позитивних (мртвих ћелија) и пропидијум-јодид негативних (живих ћелија).

Можемо закључити да су анексин негативне и пропидијум-јодид негативне ћелије живе (вијабилне), анексин позитивне и пропидијум-јодид негативне ћелије оне ћелије које се налазе у раној апоптози, анексин позитивне и пропидијум-јодид позитивне ћелије оне које су у стадијуму касне апоптозе, а анексин негативне и пропидијум-јодид позитивне ћелије, оне ћелије које су некротичне.

За потребе експеримента коришћен је *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences)*.

Након 24-часовног третмана ћелија испитавних ћелија IC_{50} вредностима ћелије су трипсинизоване и испране у *PBS*-у и растворене у пуферу за везивање ћелија (*Binding buffer*) у концентрацији од 10^6 ћелија/*mL*. Затим је у следећем кораку 100 *mL* суспензије ћелија пребачено у по три епрувете запремине 5 *mL*. Додавано је у сваку постављену епрувету 5 *mL* анексина (*Annexin V-FITC*) и 5 *mL* пропидијум-јодида (*PI*). Затим следи виртексовање ћелија и инкубација у временском интервалу од 15 минута у мраку на собној температури. Последњи корак подразумева додавање 400 *mL* пуфера за везивање ћелија и читавање добијених резултата.

Обрада и презентовање добијених резултата је подразумевала коришћење програма за проточну цитометрију *FlowJo VX*.

3.7. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Следећа фаза наше истраживачке иницијативе укључивала је темељно испитивање везано за то како наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 утичу на прогресију ћелијског циклуса ћелија хуманог сквамозног карцинома SCC-4 *in vitro*. Наш примарни циљ је био да дубље продремо у то да ли третиране туморске ћелије показују измењено понашање у поређењу са нетретираним ћелијама које се култивишу у потпуно идентичним условима, посебно фокусирајући се на то да ли ова једињења имају способност да ометају брзину деобе ћелија, било у смислу повећања брзине деобе, било у смислу смањења брзине деобе ћелија. Да бисмо ово открили, користили смо бојење ћелија пропидијум јодидом (*PI*) заједно са проточном цитометријом да бисмо испитали како наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 модулирају дистрибуцију ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса.

Основна премиса која подупиरे овај аналитички приступ се заснива на томе да је другачији афинитет везивања молекула пропидијум-јодида за молекуле ДНК зависно од тога у којој фази ћелијског циклуса се испитивана ћелија налази. Одређивањем интензитета флуоресценције који емитују молекули ДНК везани за пропидијум јодид у појединачним ћелијама, били смо у могућности да уочимо прецизну фазу ћелијског циклуса кроз коју је свака обојена ћелија пролазила. Значајно је да су диплоидне ћелије (2n) биле индикативне за ћелије које се налазе у G0/G1 фази, док ћелије са садржајем ДНК нижим од диплоидног (<2n) упућују на ћелије које пролазе кроз програмирану ћелијску смрт, односно апоптозу. Ћелије укорене, односно заустављене у S фази показивале су повећани садржај диплоидне ДНК (2n и 4n), док су ћелије смештене у G2/M фази садржавале двоструку количину ДНК молекула у поређењу са диплоидним ћелијама, што је кулминирало „квадриплоидним“ (4n) садржајем ДНК унутар њихових једра.

Процедурална методологија за анализу ћелијског циклуса одвијала се на следећи начин:

1. Туморске ћелије су подвргнуте третману са нашим новосинтетисаним комплексима паладијума(II) Pd1 и Pd2 у концентрацији која одражава њихову IC_{50} вредност у трајању од 24 сата, или су остављене нетретираним као контролна референтна тачка. Ћелијска линија сквамозног карцинома укључена у ово испитивање била је SCC-4.

2. Након третмана, и третирана и контролна кохорта ћелија је подвргнута трипсинизацији, након чега су уследиле узастопне рунде испирања са медијумом и фосфатним пуфером (PBS), што је завршено фиксацијом са ледено хладним 70% етанолом у трајању од најмање 1 сата.

3. После фиксације, ћелије су пажљиво испране ледено хладним фосфатним пуфером, подвргнуте третману РНазе и изложене раствору пропиридијум јодида, пре него што су инкубиране у специфичном окружењу које није било изложено светлости и то на собној температури. Након овог периода инкубације, ћелије су послате на анализу која се спроводила коришћењем проточног цитометра.

4. Резултати који су уследили су пажљиво обрађени и визуелно представљени коришћењем FlowJo VX софтверског пакета за проточну цитометрију.

3.8. АНАЛИЗА ПРОТЕИНА АПОПТОЗЕ

Апоптоза, кључни ћелијски процес, може се покренути кроз два доминантна пута — спољашњу и унутрашњу апоптозу. У покушају да разоткријемо замршене ћелијске механизме који се активирају деловањем наших новосинтетисаних комплекса паладијума(II) Pd1 и Pd2 који су испитивани, почели смо да квантификујемо активност и концентрације кључних протеина који регулишу апоптозу унутар SCC-4 ћелија хуманог сквамозног карцинома. Протеини од значаја које смо анализирали у овим посебно дизајнираним експериментима су били један проапоптотични протеин, конкретно у овом случају активни *bax* и један антиапоптотски протеин *bcl-2*. Поред ових протеина који су укључени у унутрашњи пут апоптозе, тестирали смо да ли долази до активације каскаде каспаза, тј. да ли је апоптоза каспаза зависна, мерењем присуства активне каспазе-3, односно процента ћелија које емитују флуоресценцију на активiranу каспазу-3.

Реагенси коришћени у овим експериментима су били следећи:

- Сет за фиксацију и пермеабилizацију ћелија - *Invitrogen™ eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, Catalog number: 88-8824-00* (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88-8824-00>)
- Примарно антитело за активни протеин *bax* - *Santa Cruz™ rabbit polyclonal IgG Anti-Bax Antibody (N-20), Catalog number: sc-493*
- Примарно обележено флуоресцеин-изотиоцијанатом (FITC) антитело за протеин *bcl-2* - *Life technologies™ bcl-2 fluorescein isothiocyanate (FITC) primary antibody, Catalog number: MHBCL01*
- Примарно антитело за активни протеин каспаза-3 - *Cell Signaling™ rabbit Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, Catalog number: #9661*
- Секундарно обележено флуоресцеин-изотиоцијанатом (FITC) антитело за необележена примарна антитела - *Abcam™ secondary goat anti-rabbit IgG-FITC antibody, Catalog number: Ab6717-1*

Сва примарна антитела су коришћена у разблажењу 1:1000, а секундарно антитело у разблажењу 1:2000.

Експериментални план који је диктирао процену кључних протеина апоптозе обухватао је следеће кораке:

1. Почетак експерименталног режима је подразумевао третман ћелија хуманог сквамозелуларног карцинома *in vitro* нашим новосинтетисаним комплексима паладијума(II) Pd1 и Pd2 у концентрацији која одражава њихову IC50 вредност током предвиђеног трајања од 24 сата, или одржавање нетретиране ћелијске популације као контролног мерила. Ћелијска линија сквамозелуларног карцинома која је била подвргнута испитивању је била линија хуманог сквамозелуларног карцинома SCC-4 *in vitro*.

2. Након третмана, и третирана и контролна ћелијска популација су подвргнуте трипсинизацији, након чега је уследило темељно прање са медијумом и ледено хладним фосфатним пуфером, прањено фиксацијом и пермеабилитацијом у складу са протоколима прописаним од стране произвођача одговарајућег сета за фиксацију и пермеабилитацију (Invitrogen™ eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set Catalog number: 88-8824-00) .

3. Да би се ублажило неспецифично везивање антитела, ћелије су подвргнуте блокади козјим серумом. Након тога смо додавали неопходна примарна антитела усмерених на активни *bax*, *bcl-2* и активну каспазу-3. После успешно завршеног бојења ћелија специфичним примарним антителима, додавана су флуоресцентно обележена секундарна антитела.

4. Након прописаног режима инкубације и испирања, степен флуоресценције ћелија на одговарајуће кључне сигналне молекуле који су укључени у процес програмиране ћелијске смрти, односно апоптозе је анализиран путем проточног цитометра. На тај начин је остварено да се измере нивои интензитета флуоресценције одговарајућих ћелија односно проценат ћелија које емитују флуоресценцију и утврдило присуство кључних протеина који регулишу апоптозу.

3.9. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА И ПРЕЗЕНТАЦИЈА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати експерименталних испитивања су последично подвргнути статистичкој анализи користећи SPSS v20, уз степен значајности који је износио 0,05 (* $p < 0,05$). За прорачун степена цитотоксичности и одређивање величине студијског узорка смо користили параметре за претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G*Power*). Узимањем у обзир резултате наведене студије, укупан студијски узорак је прорачунат на 56. То је значило да ако мерења вршимо у трипликату и у три понављања, број испитиваних вредности цитотоксичности у шест тачака далеко превазилази вредност минималне процењене величине студијског узорка ($3 \times 3 \times 7 = 63$). Сви експерименти су стога пажљиво изведени у три примерка и поновљени независно у три различита наврата како би се осигурала робусност и поузданост налаза. Избор представљања дистрибуције података као средња вредност \pm стандардна девијација или медијана \pm стандардна грешка зависио је од нормалности дистрибуције испитиваних података. Графички приказ налаза обухвата различите модалитете који могу бити тракасти графикони, дијаграме расејања, линијски графикони или различити табеларни формати.

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати наше студије обухватају одређивање степена биолошке активности паладијум једињења, снаге антитуморског ефекта како на малигним тако и на малигно неизмењеним ћелијама. Осим синтетисаних једињења паладијума, тестирано је и антитуморско дејство цисплатине и оксалиплатине. Биолошка активност претходно набројаних једињења је дефинисана уз помоћ МТТ теста у три временска интервала и израчунате су одговарајуће IC_{50} вредности (табела 1).

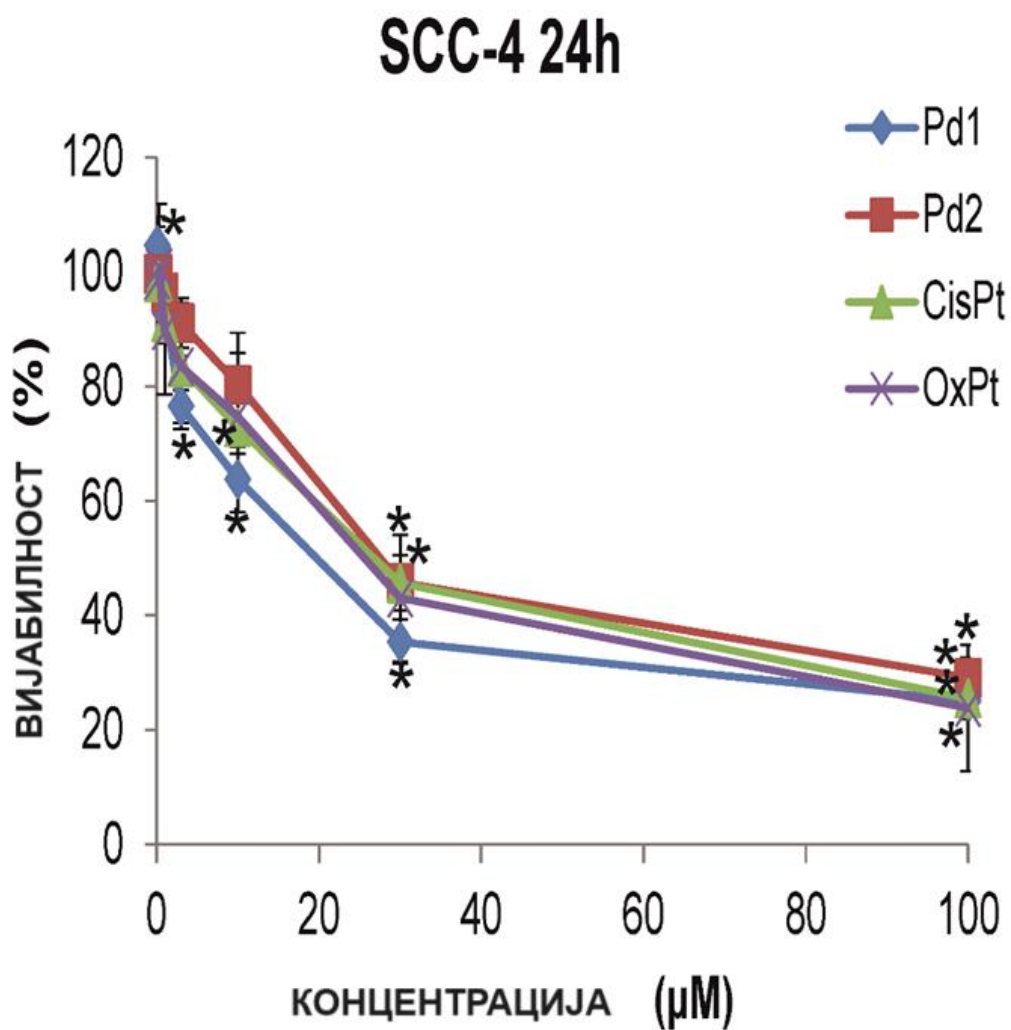
4.1. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ЋЕЛИЈЕ СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЈЕЗИКА

Обрађени резултати су демонстрирали да након третмана синтетисаним једињењем *Pd1* јавља се статистички значајан пад вијабилности *SCC-4* ћелијске линије у интервалу од 24 часа при концентрацији од $3\mu M$. Прецизније, при концентрацији од $3\mu M$ *Pd1* стопа вијабилности *SCC-4* туморских ћелија је износила $76,5\pm 3,3$ ($p<0,05$, графикон 1). Затим, након третирања *SCC-4* ћелија концентрацијама већим од $3\mu M$ ($10\mu M$, $30\mu M$, $100\mu M$) долази до статистички сигнификантног умањења вијабилности. Супротно, након третмана *Pd1* у концентрацијама мањим од $3\mu M$ не долази до значајног пада вијабилности ($p>0,05$, графикон 1).

После 24-часовног третирања *SCC-4* малигних ћелија *Pd2* једињењем, демонстриран је статистички значајан пад вијабилности при концентрацији од $30\mu M$. За саму концентрацију *Pd2* једињења од $30\mu M$ вијабилност ћелија је израчуната $45,7\pm 3,8\%$ ($p<0,05$, графикон 1). При концентрацији *Pd2* комплекса од $100\mu M$ вијабилност *SCC-4* ћелија је износила $29,1\pm 3,5\%$ ($p<0,05$, графикон 1). Приликом третирања *SCC-4* ћелија концентрацијама нижим од $30\mu M$ не долази до статистички значајног смањења вијабилности ($p>0,05$, графикон 1).

Након тестирања антипролиферативног ефекта цисплатине детектовано је статистички значајан пад вијабилности *SCC-4* малигних ћелија при концентрацији од $30\mu M$ ($p<0,05$, графикон 1). Прецизније, када је концентрација износила $30\mu M$ вијабилност *SCC-4* ћелија је израчуната $45,6\pm 4,6\%$ ($p<0,05$, графикон 1). После третирања *SCC-4* ћелија цисплатином у концентрацији од $100\mu M$ вијабилност канцерских ћелија је износила $25,5\pm 3,6\%$ ($p<0,05$, графикон 1). При третману у испитиваним концентрацијама мањим од $30\mu M$ ($0,1\mu M$, $0,3\mu M$, $1\mu M$, $3\mu M$, $10\mu M$) не долази до статистички сигнификантног пада *SCC-4* малигних ћелија ($p>0,05$, графикон 1).

После третмана растућим вредностима концентрације оксалиплатине, демонстрирано је значајно умањење вијабилности *SCC-4* ћелијске линије. Прецизније, када је концентрација износила $10\mu M$ вијабилност тестираних канцерских ћелија је износила $74,7\pm 2,3\%$ ($p<0,05$, графикон 1). При концентрацији већој од $10\mu M$ ($30\mu M$, $100\mu M$) долази до значајног пада вијабилности *SCC-4* ћелија ($p<0,05$, графикон 1). Такође, при концентрацијама мањим од $10\mu M$ ($0,1\mu M$, $0,3\mu M$, $1\mu M$, $3\mu M$) не долази до статистички значајног пада вијабилности канцерских ћелија ($p>0,05$, графикон 1).



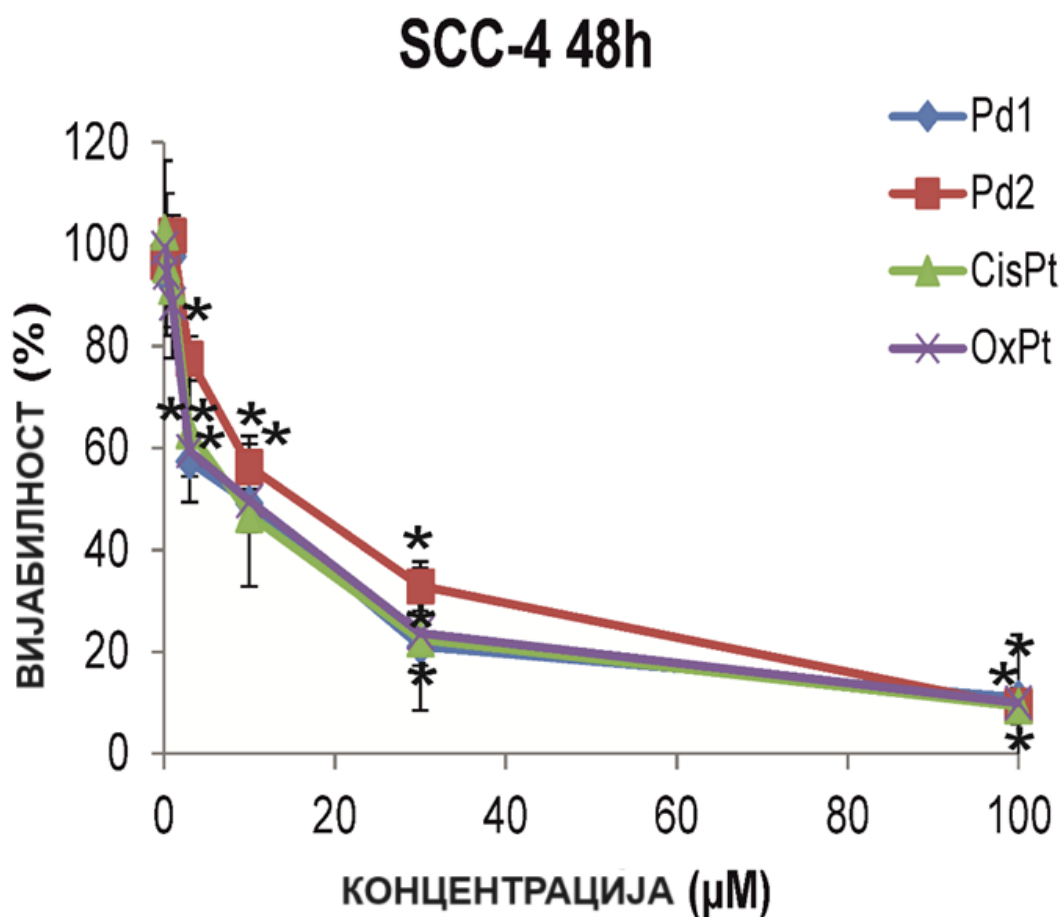
Графикон 1. Утицај различитих концентрација једињења паладијума, цисплатине, оксалиплатине на вијабилност SCC-4 ћелија након 24 часа у условима *in vitro*. * $p < 0,05$
 Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 су означени плаво, односно црвено обојеном линијом, цисплатина (CisPt) је представљена зеленом и оксалиплатина (OxPt) љубичастом бојом.

Током тестирања антипролиферативног ефекта *Pd1* једињења након 48-часовног третмана долази до статистички сигнификантног пада вијабилности *SCC-4* ћелијске линије при концентрацији $3\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Прецизније, када је концентрација износила $3\mu\text{M}$ вијабилност испитиваних канцерских ћелија је износила $57,3 \pm 2,9\%$. Када говоримо о већим концентрацијама *Pd1* једињења $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ показан је статистички значајан пад вијабилности *SCC-4* ћелијске линије ($p < 0,05$, графикон 2). Након третирања канцерских ћелија концентрацијама $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$ није детектован статистички сигнификантни пад вијабилности ($p > 0,05$, графикон).

Антипролиферативни ефекат *Pd2* једињења на *SCC-4* ћелије након 48-часовног третмана показао је да када је концентрација износила $3\mu\text{M}$ дошло је до пада вијабилности ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). При третману *SCC-4* ћелија концентрацијом *Pd2* од $3\mu\text{M}$ вијабилност је износила $77,5 \pm 3,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 2). Такође, када говоримо о растућим *Pd2* концентрацијама, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ детектован је статистички значајан пад вијабилности канцерских ћелија ($p > 0,05$, графикон 2).

После третмана цисплатином детектовано је статистички значајно умањење вијабилности *SCC-4* ћелија када је концентрација износила $3\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Прецизније, при претходно поменутој концентрацији цисплатине вијабилност канцерских ћелија је износила $63,3 \pm 4,2\%$ ($p < 0,05$, графикон 2). Када говоримо о вишим концентрацијама од $3\mu\text{M}$ ($10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$) дошло је до статистички значајног умањења вијабилности *SCC-4* ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). Супротно, концентрације ниже од $3\mu\text{M}$ ($0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$) не доводе до статистички значајног умањења вијабилности канцерских ћелија ($p > 0,05$, графикон 2).

Тестирањем антипролиферативног дејства оксалиплатине показано је да долази до статистички сигнификантног пада вијабилности *SCC-4* ћелија када је концентрација износила $3\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Стопа преживљавања канцерских ћелија при поменутој концентрацији је износила $59,4 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 2). Такође, концентрације оксалиплатине $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ доводе до статистички значајног пада вијабилности *SCC-4* ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). Након тестирања нижим концентрацијама оксалиплатине, $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$, није дошло до статистички сигнификантног пада вијабилности канцерских ћелија ($p > 0,05$, графикон 2).



Графикон 2. Утицај различитих концентрација једињења паладијума, цисплатине, оксалиплатине на вијабилност *SCC-4* ћелија након 48 часа у условима *in vitro*. * $p < 0,05$
 Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 су означени плаво, односно црвено обојеном линијом, цисплатина (CisPt) је представљена зеленом и оксалиплатина (OxPt) љубичастом бојом.

Након испитивања антипролиферативног ефекта *Pd1* једињења после култивације канцерских ћелија у временском интервалу од 72 часа демонстриран је статистички значајан пад вијабилности већ при концентрацији од $1\mu M$ ($p < 0,05$, графикон 3). Процент вијабилних малигнух ћелија је износио $90,7 \pm 1\%$. Међутим, у нижим концентрацијама од $1\mu M$ ($0,1\mu M$, $0,3\mu M$) није демонстриран статистички значајан пад вијабилности *SCC-4* ћелија ($p > 0,05$, графикон 3). При вишим концентрацијама, $3\mu M$, $10\mu M$, $30\mu M$, $100\mu M$ детектован је статистички сигнификантни пад вијабилности канцерских ћелија ($p < 0,05$, графикон 3).

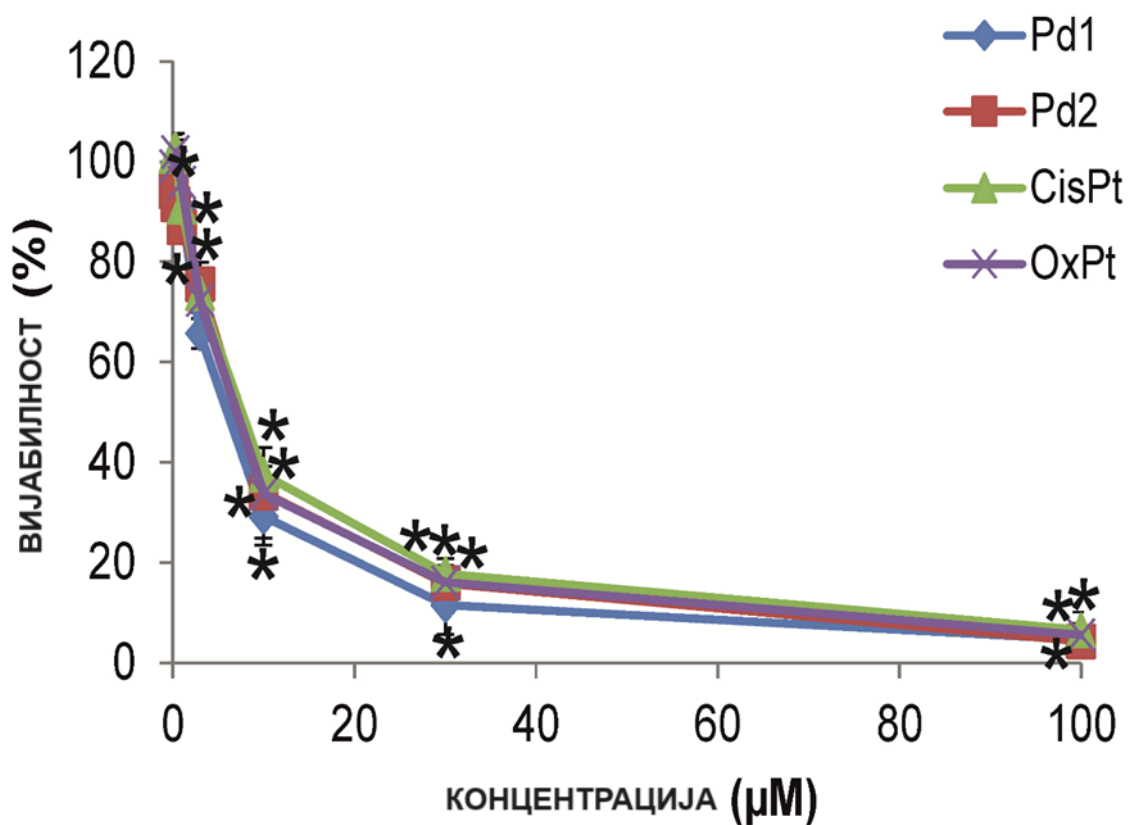
При испитивању антипролиферативног дејства *Pd2* једињења (након 72 часа) демонстрирано је да концентрација од $1\mu M$ доводи до статистички сигнификантног пада вијабилности *SCC-4* ћелија ($p < 0,05$, графикон 3). Затим при вишим концентрацијама дошло је до статистички значајног смањења вијабилности канцерских ћелија ($p < 0,05$, графикон 3). Међутим, при концентрацијама *Pd2* једињења нижим од $1\mu M$ не долази до статистички значајног пада вијабилности *SCC-4* ћелија ($p > 0,05$, графикон 3).

У присуству цисплатине и после 72 часа култивације *SCC-4* ћелија детектован је сигнификантни пад вијабилности ћелија сквамозелуларног карцинома језика већ при концентрацији од $3\mu M$ ($p < 0,05$, графикон 3). Процент вијабилних канцерских ћелија је износио $73,6 \pm 2,3\%$. При концентрацијама цисплатине вишим од $3\mu M$ ($10\mu M$, $30\mu M$, $100\mu M$) детектовано је статистички значајно умањење вијабилности ћелија ($p < 0,05$, графикон 3). Супротно, када су концентрације износиле $0,1\mu M$, $0,3\mu M$, $1\mu M$ није детектовано статистички значајно умањење вијабилности *SCC-4* ћелија ($p > 0,05$, графикон 3).

Оксалиплатина је показала снажан антипролиферативни ефекат на *SCC-4* ћелије након 72 часа инкубације. До умањења вијабилности ћелија сквамозелуларног карцинома језика дошло је при концентрацији лека од $3\mu M$, а процент вијабилних ћелија је износио $72,3 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 3). Када говоримо о вишим концентрацијама, $10\mu M$, $30\mu M$, $100\mu M$ детектовано је умањење вијабилности малигнух ћелија ($p < 0,05$, графикон 3). Поред тога, када говоримо о нижим концентрацијама оксалиплатине, $0,1\mu M$, $0,3\mu M$, $1\mu M$ није детектовано статистички значајно смањење вијабилности *SCC-4* ћелија.

На основу статистички обрађених података јасно се може закључити да је након 24-, 48- и 72-часовног третирања *SCC-4* канцерских ћелија дошло до значајног пада вијабилности, а на то нам јасно указују приказане IC_{50} вредности за *Pd1* и *Pd2* комплекс, цисплатину и оксалиплатину (табела 1).

SCC-4 72h



Графикон 3. Утицај различитих концентрација јдињења паладијума, цисплатине, оксалиплатине на вијабилност SCC-4 ћелија након 72 часа у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 су означени плаво, односно црвено обојеном линијом, цисплатина (CisPt) је представљена зеленом и оксалиплатина (OxPt) љубичастом бојом.

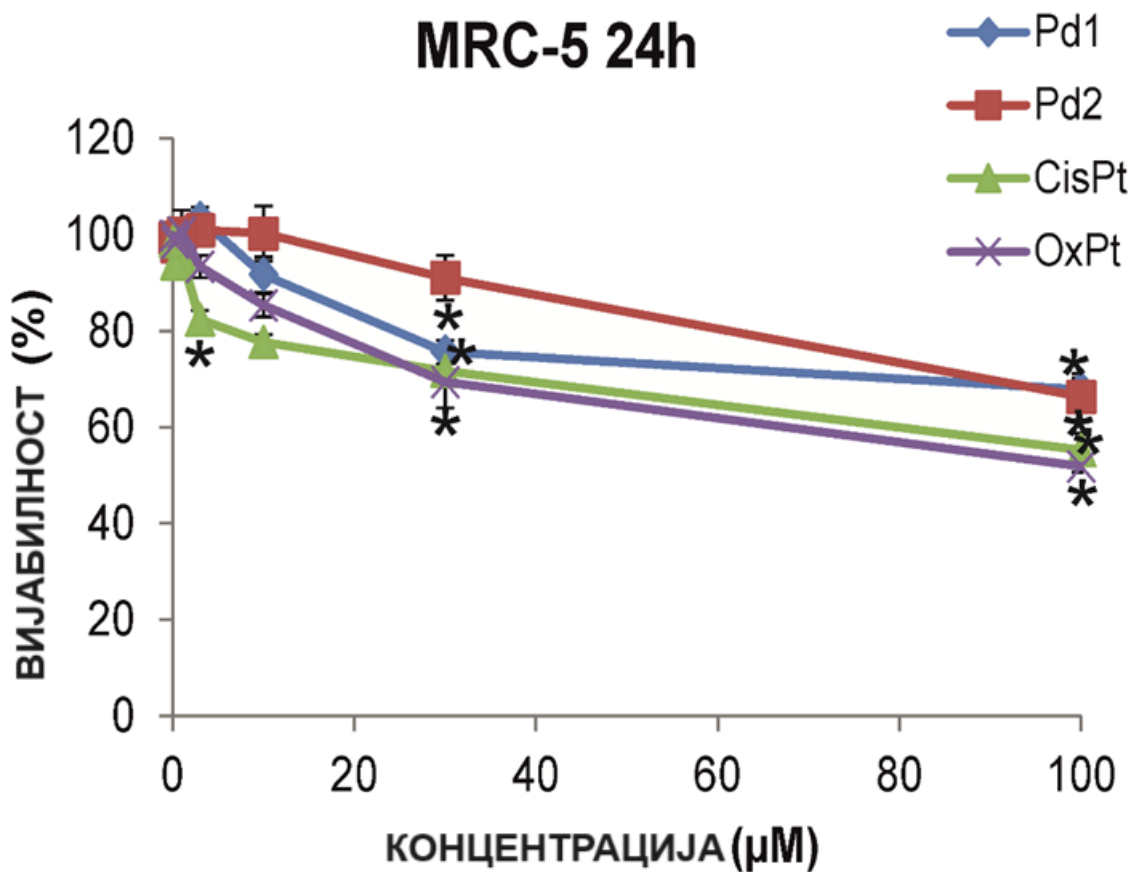
4.2. АНТИПРОЛИФЕРАТИВНИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА МАЛИГНО НЕИЗМЕЊЕНЕ ЋЕЛИЈЕ ФИБРОБЛАСТА

Након 24-часовне икубације и третмана *Pd1* комплексом на *MRC-5* ћелијској линији демонстриран је статистички значајан пад вијабилности ћелија при концентрацији од $30\mu\text{M}$. Процент вијабилних ћелија је износио $75,2 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$, графикон 4). Затим, до статистички сигнификантног пада вијабилности малигно неизмењених ћелија долази када концентрација износи $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 4). Даље, када смо третирали ћелије *Pd1* комплексом у концентрацијама од $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ нисмо детектовали статистички сигнификантан пад вијабилности *MRC-5* ћелија ($p > 0,05$, графикон 4).

После 24-часовног раста *in vitro* условима и третмана *Pd2* једињењем само у концентрацији од $100\mu\text{M}$ детектован је статистички сигнификантни пад вијабилности *MRC-5* ћелија ($p < 0,05$, графикон 4). Прицент вијабилних ћелија је износио $66,2 \pm 4,1\%$. Насупрот томе, приком третирања ћелија концентрацијама нижим од $100\mu\text{M}$ ($0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ и $30\mu\text{M}$) нису детектоване статистички сигнификантне промене вијабилности малигно неизмењених ћелија ($p > 0,05$, графикон 4).

Контролни лек цисплатина је након након 24 часовне култивације демонстрирао значајан пад вијабилности фибробласта већ при концентрацији од $3\mu\text{M}$, а израчунат проценат ћелија које су вијабилне је износио $82,3 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$, графикон 4). Концентрације веће од $3\mu\text{M}$ су довеле до пада вијабилности малигно неизмењених ћелија ($p < 0,05$, графикон 4). После третмана *MRC-5* ћелија концентрацијама $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, није детектована статистички сигнификантна промена вијабилности ($p > 0,05$, графикон 4).

Тестирана оксалиплатина је значајно смањила вијабилност фибробласта при концентрацији од $30\mu\text{M}$, а израчунати проценат вијабилних ћелија је износио $69,3 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 4). Такође, када говоримо о максималној концентрацији од $100\mu\text{M}$ дошло је до статистички значајног пада вијабилности малигно неизмењених ћелија ($p < 0,05$, графикон 4). Третирањем мањим концентрацијама од $30\mu\text{M}$ ($0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$) није дошло до статистички сигнификантне промене вијабилности фибробласта ($p > 0,05$, графикон 4).



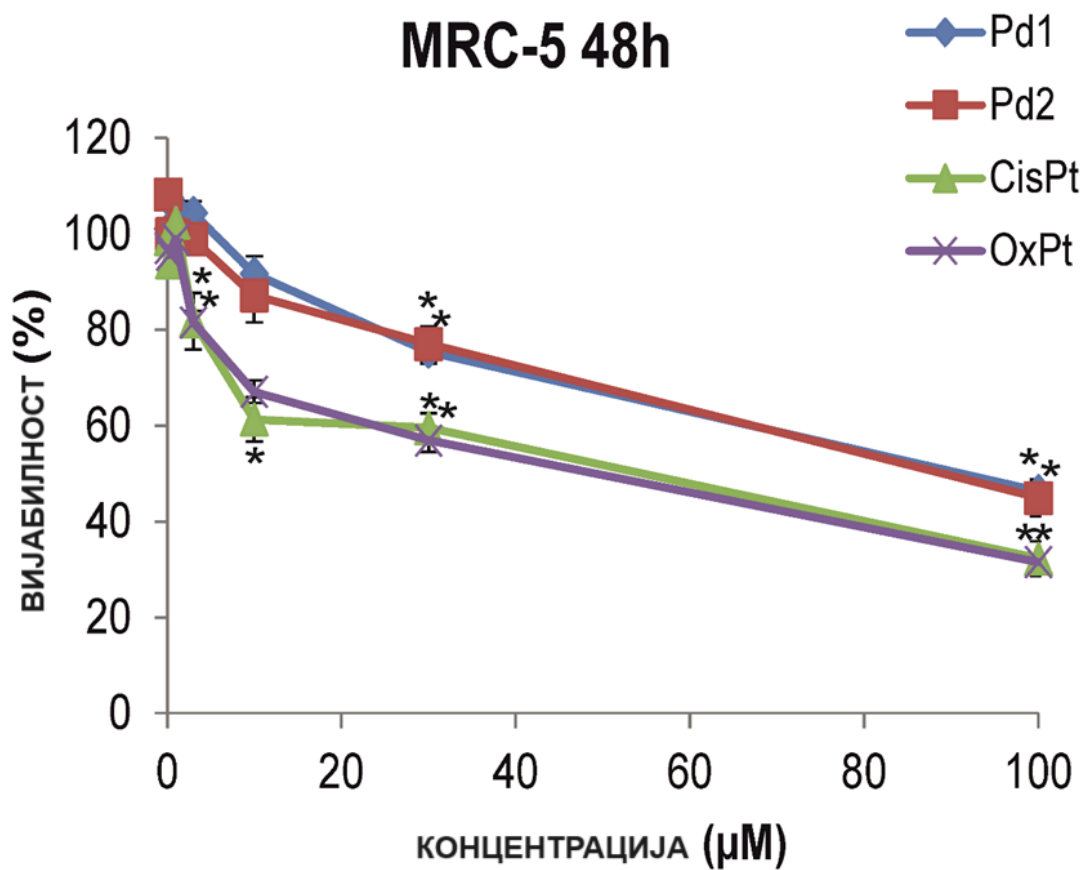
Графикон 4. Утицај различитих концентрација једињења паладијума, цисплатине, оксалиплатине на вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 су означени плаво, односно црвено обојеном линијом, цисплатина (CisPt) је представљена зеленом и оксалиплатина (OxPt) љубичастом бојом.

Једињење *Pd1* је показало изузетно слабо антипролиферативно дејство на *MRC-5* ћелије након 48-часовне култивације. При концентрацији једињења од $30\mu\text{M}$ дошло је до статистички значајног пада вијабилности, при чему је вредност износила $75,4 \pm 2,4\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). Затим, када говоримо о максималној концентрацији од $100\mu\text{M}$ дошло је до статистички значајног пада вијабилности малигно неизмењених ћелија ($p < 0,05$, графикон 5). Супротно, када говоримо о концентрацијама нижим од $30\mu\text{M}$ није дошло до измене вијабилности *MRC-5* ћелија ($p > 0,05$, графикон 5).

Испитивано једињење *Pd2* после 48-часовне култивације, демонстрирало је веома слабо антипролиферативно дејство на малигно неизмењене фибробласте. Статистички значајно умањење вијабилности детектовано је при концентрацији $30\mu\text{M}$, при чему је вијабилност достигла $77,1 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). Када говоримо о максималној концентрацији $100\mu\text{M}$ демонстриран је статистички значајан пад вијабилних ћелија ($p < 0,05$, графикон 5). При концентрацијама мањим од $30\mu\text{M}$ није демонстриран значајан антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 5).

Цисплатина је демонстрирала статистички значајан антипролиферативни ефекат већ при концентрацији од $3\mu\text{M}$, при чему је вијабилност ћелија износила $81,8 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). Када говоримо о концентрацијама цисплатине вишим $3\mu\text{M}$ демонстриран је статистички значајан антипролиферативни ефекат на *MRC-5* ћелије ($p < 0,05$, графикон 5). Са друге стране после 48-часовне култивације ћелија и третмана концентрацијама $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ нису детектоване статистички сигнификантне промене у проценту вијабилних фибробласта ($p > 0,05$, графикон 5).

Након тестирања антипролиферативног дејства оксалиплатине, демонстрирано је да концентрација од $3\mu\text{M}$ условљава статистички сигнификантни пад процента вијабилних *MRC-5* ћелија ($p < 0,05$, графикон 5). Вредност вијабилних фибробласта је достигла $81,8 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). Након третирања концентрацијама оксалиплатине вишим од $3\mu\text{M}$ дошло је до сигнификантног антипролиферативног ефекта на малигно неизмењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 5). Међутим, ниже концентрације лека $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ нису демонстрирале значајан антипролиферативни ефекат на фибробласте ($p > 0,05$, графикон 5).



Графикон 5. Утицај различитих концентрација једињења паладијума, цисплатине, оксалиплатине на вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 су означени плаво, односно црвено обојеном линијом, цисплатина (CisPt) је представљена зеленом и оксалиплатина (OxPt) љубичастом бојом.

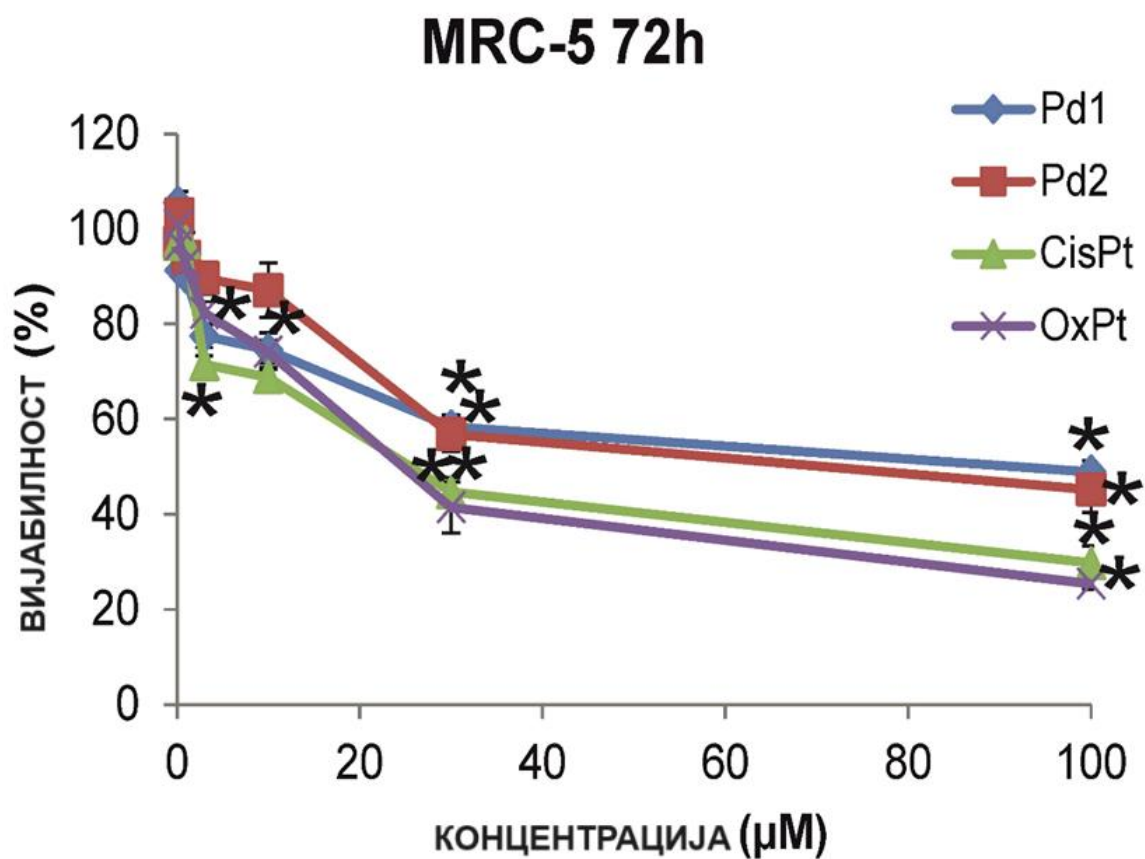
После 72 часа култивације фибробласта *Pd1* је показао изузетно слабо антипролиферативно дејство на малигно неизмењене ћелије. До статистички значајног антипролиферативног ефекта дошло је након третмана ћелија у концентрацији од $10\mu\text{M}$, при чему је детектована вијабилност износила $74,1 \pm 3,6\%$ ($p < 0,05$, графикон 6). Када говоримо о концентрацијама вишим од $10\mu\text{M}$, такође је детектован статистички значајан антипролиферативни ефекат на фибробласте ($p < 0,05$, графикон 6). Након третмана ћелија концентрацијама $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ демонстриран је значајан антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 6). Ниже концентрације *Pd1* једињења, нису довеле до сигнификантног антипролиферативног ефекта ($p > 0,05$, графикон 6).

Наше студија је јасно демонстрирала да након 72-часовног третмана фибробласта при концентрацији *Pd2* једињења од $30\mu\text{M}$ долази до снажног антипролиферативног ефекта, при чему проценат вијабилних ћелија износи $56,8 \pm 3,6\%$ ($p < 0,05$, графикон 6). При максималној концентрацији од $100\mu\text{M}$ такође је детектован статистички значајан антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 6). Када говоримо о нижим концентрацијама од $30\mu\text{M}$ није детектована сигнификантна антипролиферативна активност тестираног једињења ($p > 0,05$, графикон 6).

Третман малигно неизмењених фибробласта цисплатином након 72-часовне култивације демонстрирао је статистички значајан антипролиферативни ефекат при концентрацији од $3\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 6). Затим, при вишим концентрацијама $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ је детектован статистички значајан антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 6). Када говоримо о нижим концентрацијама $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ није детектован статистички значајан антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 5).

Наше истраживање је јасно демонстрирало да након третмана оксалиплатином и 72-часовне култивације фибробласта долази до статистички значајне антипролиферативне активности при концентрацији од $3\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 6). При вишим концентрацијама $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ такође је детектована статистички значајна антипролиферативна активност ($p < 0,05$, графикон 6). Са друге стране третмана *MRC-5* ћелија концентрацијама $0,1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ изостао је статистички значајан антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 6).

Цисплатин и оксалиплатин се користе у лечењу многих врста карцинома, али се током терапије овим цитостатицима примећује повећана резистенција туморских ћелија. Стога је модификација различитих хемијских група и синтеза нових једињења која садрже друге прелазне метале као што је паладијум једно од могућих решења за превазилажење овог проблема. Комплекси паладијума се тренутно користе у лечењу рака простате и хороидалних метастаза, између осталог (68). Наши комплекси паладијума *Pd1* и *Pd2* су показали одлична антиканцерогена својства, упоредива са цисплатином и оксалиплатином, али је њихов ефекат на фибробласте био знатно повољнији, тј. имали су мали ефекат на немалигне ћелије што може указивати на потенцијално мање нежељених ефеката ових комплекса (Табеле 1 и 2).



Графикон 6. Утицај различитих концентрација једињења паладијума, цисплатине, оксалиплатине на вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ Наши новосинтетисани комплекси паладијума(II) Pd1 и Pd2 су означени плаво, односно црвено обојеном линијом, цисплатина (CisPt) је представљена зеленом и оксалиплатина (OxPt) љубичастом бојом.

| IC ₅₀ values (μ M) | SCC-4 | | | | MRC-5 | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|---------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | Pd1 | Pd2 | CisPt | OxPt | Pd1 | Pd2 | CisPt | OxPt |
| 24h | 17.4 \pm 2.3 | 38.2 \pm 2.8 | 36.4 \pm 2.1 | 35 \pm 2.4 | 184.7 \pm 10.7 | 151.3 \pm 9.2 | 108 \pm 9.6 | 102 \pm 7.1 |
| 48h | 6.6 \pm 1.8 | 10.7 \pm 1.4 | 8.7 \pm 2.4 | 7.4 \pm 2.1 | 87.1 \pm 8.8 | 74 \pm 8.3 | 46 \pm 5.7 | 34 \pm 4.9 |
| 72h | 5.4 \pm 1.2 | 6.9 \pm 1.9 | 7.8 \pm 1.6 | 6.3 \pm 1.5 | 68 \pm 5.9 | 78 \pm 6.5 | 27.4 \pm 3.8 | 25.5 \pm 2.3 |

Табела 1. IC₅₀ вредности наших новосинтетисаних комплекса паладијума(II) Pd1 и Pd2, цисплатине (CisPt) и оксалиплатине (OxPt) на SCC-4 и MRC-5 ћелијама.

| Индекс селективности IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ | Pd1 | Pd2 | CisPt | OxPt |
|---|--------|--------|-------|-------|
| SCC-4 | 12.593 | 10.725 | 3.513 | 4.048 |

Табела 2. Индекс селективности комплекса Pd1 и Pd2, цисплатине (CisPt) и оксалиплатине (OxPt) након 72 сата третмана SCC-4 ћелија.

4.3. ЈЕДИЊЕЊА ПАЛДИЈУМА АКТИВИРАЈУ ПРОЦЕС ПРОГРАМИРАНЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ ЋЕЛИЈА СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЈЕЗИКА, SCC-4

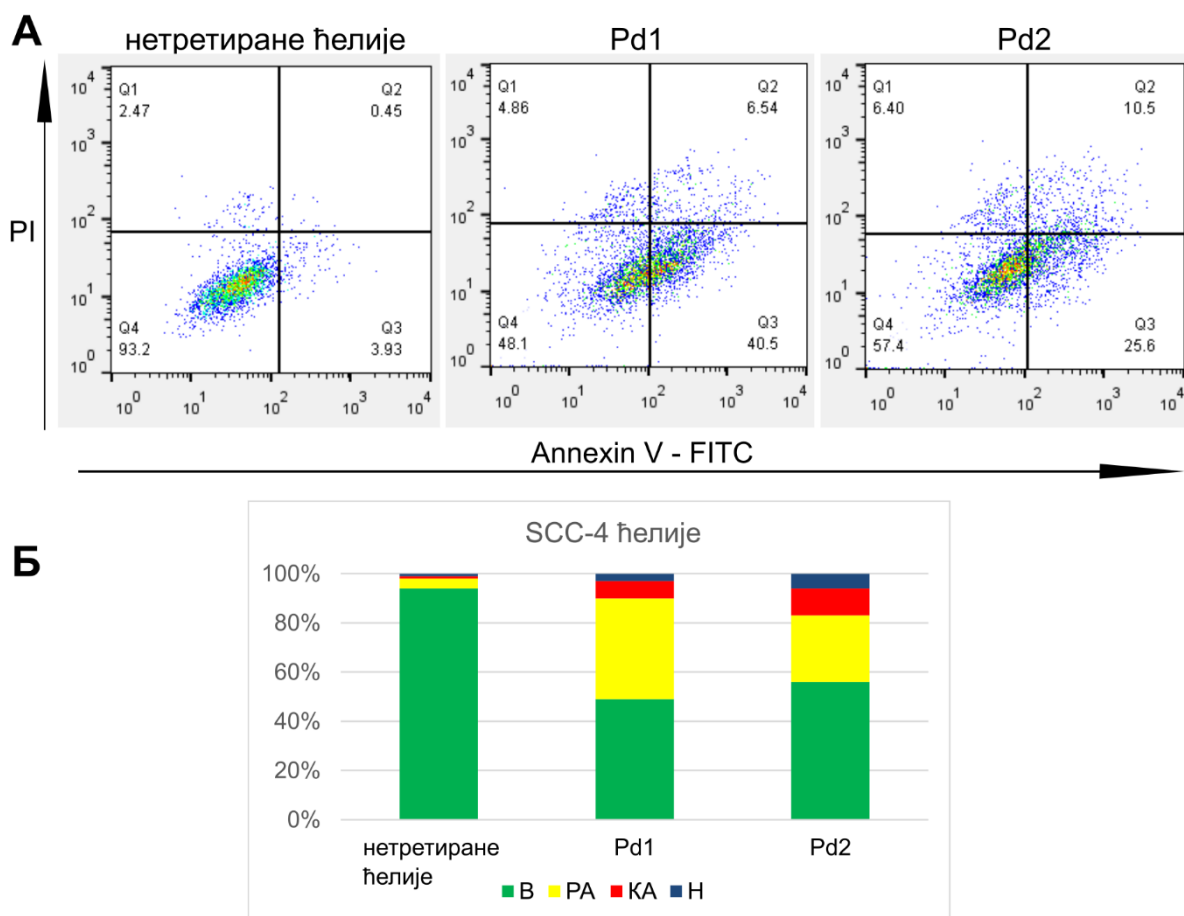
На основу претходно обрађених резултата, наша студија је јасно демонстрирала да два синтетисана једињења обележена као *Pd1* и *Pd2* показују јак антипролиферативни ефекат на малигне ћелије SCC-4. Такође, применом МТТ теста синтетисани комплекси су демонстрирали умерен антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене фибробласте. Стога, следећи корак у нашем истраживању обухвата тестирање којим доминантним типом ћелијске смрти долази до промене вијабилности (смањења) малигнух SCC-4 ћелија. Ћелије сквамоцелуларног кацинома језика третиране су пртходно израчунатим IC_{50} вредностима. Затим је помоћу *Annexin V/7AAD* методе прецизно детектован тип ћелијске смрти малигнух ћелија.

Малигно измењене SCC-4 ћелије су третиране IC_{50} концентрацијом, даље су након 24-часовне култивације бојене претходно поменутом методом. Контролна популација SCC-4 ћелија није третирана синтетисаним једињењима. Тачан проценат апоптотских ћелија детектован је *FACS* анализом.

Највећи проценат нетретираних малигно измењених SCC-4 ћелија чиниле су вијабилне ћелије, и вредност је износила 92%. Затим 7% SCC-4 ћелија детектовано је у апоптотичном стадијуму, активирана је рана и касна апоптоза. Само 1% SCC-4 ћелија детектован је у стадијуму некрозе. Пошто се ради о контроли, нетретираној ћелијској популацији, очекивали смо детекцију у највећем процентун вијабилних ћелија.

Наше истраживање је јасно демонстрирало да након третмана *Pd1* комплексом долази до снажног антипролиферативног ефекта активацијом процеса програмиране ћелијске смрти SCC-4 ћелија. Прецизније, при концентрацији од $17.4\mu M$ код око 35% од укупног броја ћелија активиран је процес ране апоптозе. Такође, код око 10% од укупног броја малигнух ћелија активиран је процес касне апоптозе. Можемо закључити да је око половина од укупне ћелијске популације активирала процес програмиране ћелијске смрти. Активирање процеса некрозе детектовано је код око 5% третираних SCC-4 ћелија. Стога, јасно је да је једињење *Pd1* показало снажан антипролиферативни ефекат индуковањем процеса апоптозе (графикон 7).

Након третмана SCC-4 ћелија *Pd2* комплексом након култивације од 24 часа проценат детектованих вијабилних ћелија је износио 57%. Затим, 25% је детектовано у раној апоптотичној фази, док је око 10% ћелија детектовано у касној апоптотској фази. Процес некрозе активирало је око 8% тестираних SCC-4 ћелија. Можемо извести јасан закључак да је *Pd2* једињење показало снажан антипролиферативни ефекат на малигне ћелије активацијом ране апоптозе (графикон 7).



Графикон 7. Процент детектованих вијабилних, апоптотичних и некротичних ћелија. Проточна цитометријска анализа ћелија SCC-4 обојених *Annexin V/PI*. Тачкасти графикони представљају проценат вијабилних (доњи леви квадрант), раних апоптотичких (доњи десни квадрант), касних апоптотичких (горњи десни квадрант) и некротичних (горњи леви квадрант) ћелија код нетретираних (контрола) и третираних (IC_{50} Pd1 и Pd2) SCC-4 ћелија. Резултати су представљени као репрезентативни графикони густине (dot-plot дијаграми) *Annexin V/PI* и PI бојења (A) и 2D стубичастих графикона (B) са просечним вредностима вијабилних (V), раних апоптотичких (PA), касних апоптотичких (KA) и некротичних (H) ћелија из три независна експеримента.

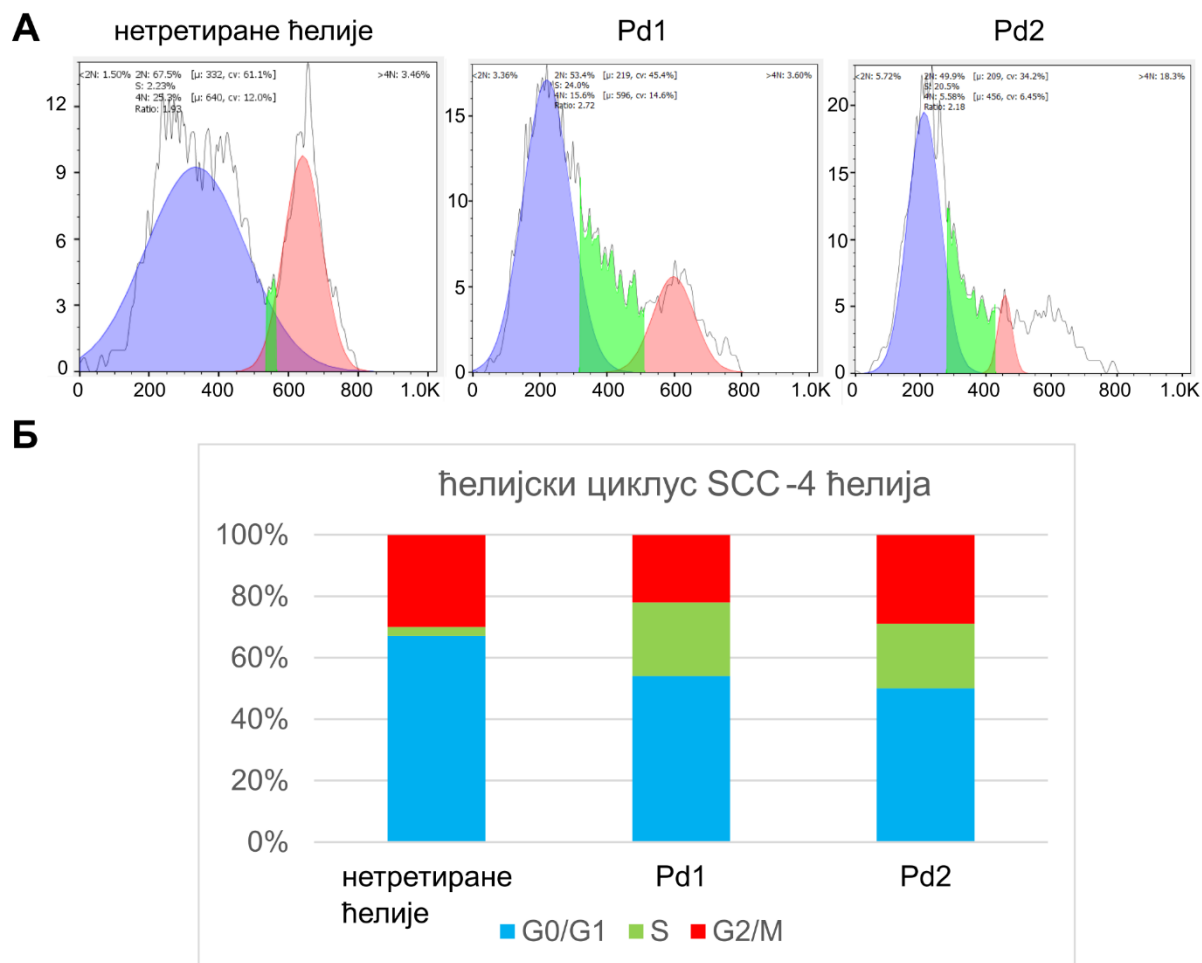
4.4. ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ ЗАСТОЈ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА SCC-4 ЋЕЛИЈА

Снажан антипролиферативни ефекат на туморске ћелије се може достићи на више начина. Један начин обухвата активацију унутрашњег или спољашњег апоптотског пута, док се снажни антипролиферативни ефекат такође може постићи индукцијом застоја ћелијског циклуса у различитим фазама. Након што је демонстрирано да *Pd1* и *Pd2* једињења показују снажан антипролиферативни ефекат на *SCC-4* ћелије индукцијом процеса ране и касне апоптозе, следећи задатак наше студије је обухватио утицај поменутих комплекса на ћелијски циклус. Тестирана ћелијска линија је третирана претходно израчунатим IC_{50} вредностима након 24-часовне култивације. Заправо у нашем истраживању је рађена детекција *SCC-4* ћелија које се различитим фазама циклуса, бојењем пропиридијум јодидом.

Контролна ћелијска популације није третирана *Pd1* и *Pd2* комплексима, а након 24-часовне култивације 67% ћелија детектовано је у G_0/G_1 фази. Затим 30% *SCC-4* ћелија је детектовано у G_2/M фази ћелијског развоја. Мали проценат ћелија (3%) детектован у *S* фази ћелијског циклуса (графикон 8).

Након третирања *Pd1* једињењем око 54% ћелија детектовано је у G_0/G_1 фази. Даље, око 22% обојених малигних ћелија налазило се у G_2/M фази ћелијског циклуса, док је око 24% детектовано у *S* фази. Претходно поменуте бројке нам указују да је у односу на контролну ћелијску популацију највећи скок процента детектованих ћелија био у *S* фази. Прецизније, можемо рећи да антипролиферативни ефекат комплекса *Pd1* се заснива на активацији ране апоптозе и индукцији застоја ћелијског циклуса (графикон 8).

Применом комплекса *Pd2* након 24-часовне култивације детектиовано је 50% ћелија у G_0/G_1 фази. У *S*-фази ћелијског циклуса детектовано је 21% *SCC-4* ћелија. На крају, детектовани проценат канцерских ћелија у G_2/M фази ћелијског циклуса је износио 29%. Претходно наведене чињенице нам јасно указују да је третманом *Pd2* једињења детектован застој у *S*-фази ћелијског циклуса у поређењу са контролном ћелијском популацијом. Такође, можемо рећи да снажан антипролиферативни ефекат *Pd2* комплекс има захваљујући активацији ране и касне апоптозе и индукцији застоја ћелијског циклуса (графикон 8).



Графикон 8. Детекција и проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. Ефекти комплекса Pd1 и Pd2 на дистрибуцију ћелијског циклуса SCC-4 ћелија. Резултати су представљени као репрезентативни дијаграми PI бојења (A) и 2D стубичастих графикона (B) са просечним вредностима ћелија у G0/G1 (плава), S (зелена) и G2/M (црвена) фази ћелијског циклуса из три независна експеримента.

4.5. ТЕСТИРАНА ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА АКТИВИРАЈУ МИТОХОДРИЈАЛНИ АПОПТОТСКИ СИГНАЛНИ ПУТ

Активација апоптозе може се постићи преко два сигнална пута, пут посредован рецептором (спољашњи пут) и митохондријални пут (унутрашњи).

За покретање спољашњег апоптотског пута неопходно је везивање одговарајућег лиганда за „рецептор смрти“. Након тога следе каскадне реакције и активација егзекуторских каспаза.

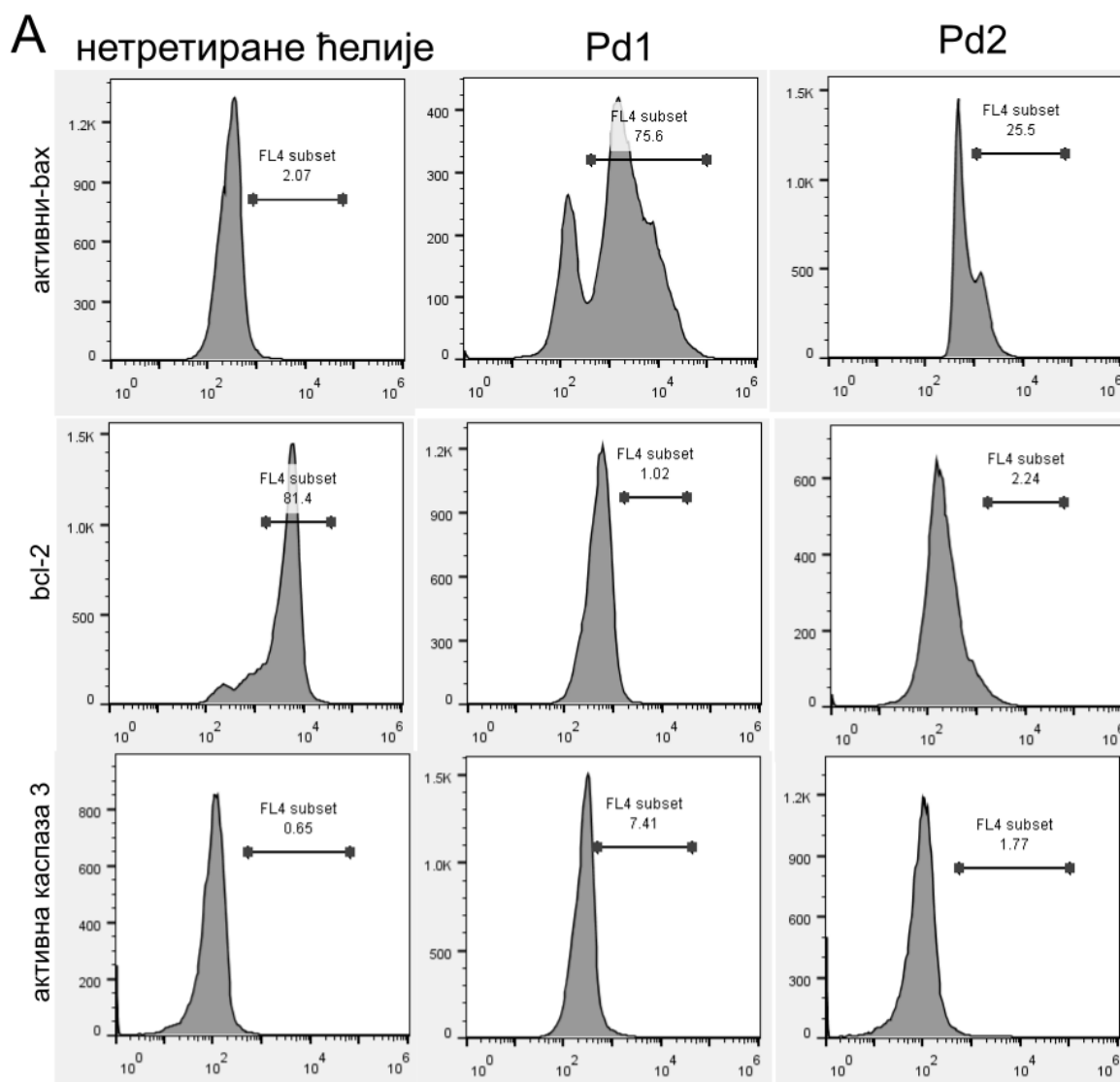
Приликом активирања митохондријалног пута долази до промена концентрације и односа проапоптотских и антиапоптотских молекула. Прецизније, кључни корак у активацији унутрашњег митохондријалног пута чини раст концентрације *Bax* протеина. Проапоптотски *Bax* протеини мигрирају из цитосола у спољашњу митохондријалну мембрану, при чему се формирају поре и долази до отпуштања митохондријалног садржаја. Долази до изласка цитохрома *c* у цитосол, услед тога се активира каспаза-3. Апоптотични „остаци“ бивају фагоцитовани од стране макрофага.

Након што је наша студија демонстрирала да једињења паладијума *Pd1* и *Pd2* индукују процесе ране и касне апоптозе, следећи корак је обухватио испитивање молекуларних механизма који учествују у активацији програмиране ћелијске смрти. Тестиран је ефекат паладијум једињења након 24-часовне култивације на концентрацију протеина *Bax*, *Bcl-2* и каспазе-3. Детекцијом *MFI* (енг. *mean fluorescence intensity*) одредили смо тачну концентрацију претходно поменутих протеина, такође детектован је проценат *SCC-4* ћелија које су емитовале флуоресценцију (графикон 9).

Обрађени резултати у нашој студији показују да тестирана паладијум једињења *Pd1* и *Pd2* активирају митохондријални апоптотски пут. Заправо, *Pd1* и *Pd2* комплекси активирају унутрашњи сигнални пут статистички значајним повећањем *MFI* за *Bax* протеин у поређењу са контролном ћелијском групом (графикон 14). Код нетретираних *SCC-4* ћелија, контрола, вредност *MFI* за *Bax* протеин је износила 146. Са друге стране код третираних малигних ћелија *MFI* за *Bax* протеин је износио 268 (за комплекс *Pd1*) и 213 (за комплекс *Pd2*).

Код тестиране контролне *SCC-4* популације ћелија *MFI* вредност за антиапоптотски *Bcl-2* протеин је износила 189, док је код третираних ћелија вредности *MFI* су износиле 27 (комплекс *Pd1*) и 68 (комплекс *Pd2*). Дакле, закључак је да код третираних малигних ћелија долази до статистички сигнификантног пада концентрације антиапоптотског *Bcl-2* молекула у односу на нетретирану контролну популацију (графикон 9).

Резултати нашег истраживања су јасно демонстрирали да је у основи након третмана комплексима паладијума (*Pd1* и *Pd2*) дошло пада односа *Bcl-2/Bax* протеина, чиме се стварају услови за активацију митохондријалног пута апоптозе. Из тог разлога, наш следећи корак је обухватио детекцију агзекуторске каспазе-3. Након третирања *SCC-4* ћелија са *Pd1* и *Pd2* комплексима детектован је скок концентрације егзекуторске каспазе-3 у компарацији са контролном популацијом ћелија (графикон 9).



B

| | нетретиране ћелије | Pd1 | Pd2 |
|---------------------------------|-----------------------|-----|-----|
| bax MFI | 146 | 268 | 213 |
| bcl-2 MFI | 189 | 27 | 68 |
| % ћелија са акт. касп. 3 | 0.7 | 7.3 | 1.8 |

Графикон 9. Ефекат једињења палладијума на концентрацију и активацију протеина апоптозе код ћелија сквамозелуларног карцинома језика, *SCC-4*. Ефекти комплекса Pd1 и Pd2 на ћелијску концентрацију проапоптотичког протеина активни-bax, антиапоптотичког протеина bcl-2 и проценат *SCC-4* ћелија које показују активну каспазу-3. Резултати су представљени као репрезентативни дијаграми проточне цитометрије (A) и табела (B) са средњим вредностима просечног интензитета флуоресценције (MFI) за активни-bax и bcl-2, и процентом ћелија са активном каспазом-3 из три независна експеримента.

5. ДИСКУСИЈА

Развој канцерогенезе је веома сложен процес и обухвата више стадијума кроз које пролази малигно трансформисана ћелија. Тумори су након кардиоваскуларних болести водећи узрок смрти и представљају велики здравствени проблем. Повећана стопа смртности код оболелих од карцинома је узрокована одсуством раних симптома као и касно постављеном дијагнозом (2, 4).

У циљу успешног лечења и превенције неопходно је детаљно разумевање процеса канцерогенезе.

Малигнитети имају могућност развија у сваком органу. Сам процес развоја малигнитета веома је сложен и најчешће је узрок оштећење *ДНК* молекула, што доводи до убрзане пролиферације и малигне трансформације. Саме промене које настају услед оштећења молекула *ДНК* називамо мутације. Такође, малигна трансформација се може развити услед појачане активације гена задужених за активацију ћелијске деобе као и услед инактивације гена чија је улога у инхибицији раста ћелије (246).

Метаболизам малигно трансформисаних ћелија је различит у односу на метаболичке путеве малигно неизмењених ћелија. Повећана је синтеза *ДНК* молекула, услед повећане пролиферације канцерских ћелија. Такође, долази до повећане синтезе структурних протеина, протеолитичких ензима и протеинских рецептора (7).

Осим јасно дефинисаних и детектованих промена у експресији гена канцерских ћелија, такође постоје и промене у самом метаболизму. Процес анаеробне гликозе има есенцијалну улогу у развоју малигнитета, стога јасно је да постоји повећан степен активности ензима који учествују у овом биохемијском процесу. Кисела средина присутна у канцерским ћелијама води порекло од лактата који је заправо производ процеса анаеробне гликолизе (86).

Такође, постоји разлика у структури митохондрија и ћелијске мембране између канцерске и малигно неизмењене ћелије. Транспорт угљених хидрата и јона је повећан због самих енергетских потреба канцерских ћелија. Разлике у структури као и у транспорту доприносе убрзаној пролиферацији туморских ћелија (7).

Смањена адхезивност туморских ћелија омогућава да дође до појава метастаза. Прецизније ћелије могу да одвоје и да стварају секундарне депозите у удаљеним ткивима. Тиме малигне ћелије могу бити узрок оштећења удаљених ткива при чему може доћи и до нарушавања физиолошке функције (247).

Терапијски приступ у лечењу малигнитета је веома сложен и обухвата хирушка ексцизију, зрачење и хемиотерапију. Такође, постоји могућност комбиновања претходно наведених терапијских мера. Основ за потпуно лечење је заправо рано дијагностиковање и адекватна терапијска мера (2, 4).

Процес програмиране ћелијске смрти има есенцијалну улогу у развоју малигнитета. Овај веома сложени процес може се активирати митохондријалним или спољашњим путем. Након што је процес апоптозе активиран у серији каскадних реакција долази до формирања структура које називамо апоптотска телашаца. Приликом одвијања процеса апоптозе не долази до повећаног стварања цитокина, заправо не долази до активације инфламаторног процеса (248).

Како би дошло до активације спољашњег пута неопходно је везивање одговарајућег лиганда за рецептор смрти. Након серије каскадних реакција долази до активације ефекторске каспазе-3 и формирања апоптозома. Унутрашњи апоптотски пут настаје услед промена (оштећења) у структури *ДНК* молекула, оштећења ћелијских органела. Приликом активације овог пута долази до губитка трансмембранског потенцијала митохондрија и транслокације цитохорма *c* у цитоплазму. Након тога долази до активације каспазе-3 и формирања апоптозома. Од есенцијалног значаја за одигравање процеса апоптозе је присуство протеина који регулишу апоптозу, протеини *Bcl-2* суперфамилије. Малигно трансформисане ћелије имају могућност инхибиције апоптозе, чиме је омогућен повећан степен пролиферације и активни развој канцерогенезе (93).

Код малигно неизмењених ћелија процес ћелијске деобе је строго контролисан и подељен је у више активних циклуса: *G1*, *S*, *G2* и *M*. Уколико дође до оштећења *ДНК* молекула ћелијски циклус је стопиран, све у циљу репарације и могућности наставка. У случају већег оштећења сама ћелија активира унутрашњи митохондријални пут. Сматра се да у процесу канцерогенезе осим поремећаја у процесу апоптозе, долази и до поремећаја у самом одвијању ћелијског циклуса, што заправо даје могућност канцерским ћелијама да имају повећан степен пролиферације (193).

Савремена терапија антиканцерским лековима је показала снажан антипролиферативни ефекат индукцијом застоја у различитим фазама ћелијског циклуса. Међутим, кључни недостатак хемиотерапеутика је неселективност, при чему лекови показују снажан антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије. Поред тога, услед дуготрајне примене ових лекова може се јавити резистенција, при чему малигна ћелија развија механизме „одбране“ од хемиотерапеутика. Јасно је да претходно поменути недостаци антитуморске терапије воде ка појави веома озбиљних нежељених ефеката (2, 4).

Синтеза нових потенцијалних хемиотерапеутика тежи да превазиђе недостатке као што су неселективност и резистенција, што је заправо есенцијално у терапијском приступу малигнитета.

Први корак у испитивању антипролиферативног ефекта потенцијалних хемиотерапеутика је заправо тестирање цитотоксичности *MTT* тестом.

У нашем истраживању тестиран је антипролиферативни ефекат два синтетисана *Pd(II)* комплекса обележених као *Pd1* и *Pd2* на ћелије сквамозелуларног карцинома језика *SCC-4*.

Наше истраживање је показало да након апликовања *Pd1* и *Pd2* долази до пада вијабилности тестираних малигнућ ћелија *SCC-4*. Прецизније, смањење вијабилности *SCC-4* је јасно детектовано у три временска периода 24, 48 и 72 часа *in vitro*. Након 24h инкубације, комплекс *Pd1* је показао најснажнији антипролиферативни ефекат при чему је израчуната IC_{50} вредност износила $17,4\mu M$. Такође, комплекс обележен као *Pd2* показао је умерен антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије након 24h инкубације, при чему је добијена IC_{50} вредност износила $38,2\mu M$. Израчунате IC_{50} вредности за цисплатину и оксалиплатину након 24h инкубације су износиле $36\mu M$ и $35\mu M$. Можемо закључити да су оба хемиотерапеутика показала умерен антипролиферативни ефекат после 24h инкубације.

Након 48h инкубације једињења *Pd1* и *Pd2* су демонтрирала веома снажан антипролиферативни ефекат на *SCC-4* канцерске ћелије. Прецизније, израчуната IC_{50} вредност за *Pd1* једињење након 48h инкубације је износила $6\mu M$. Затим, израчуната IC_{50} концентрација за *Pd2* је износила $10\mu M$. Контролни лек, цисплатина је такође демонстрирао снажан антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије, при чему IC_{50} вредност износила $8\mu M$. Затим, након 48h инкубације IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $7\mu M$, чиме је и овај контролни лек демонстрирао снажан антипролиферативни ефекат.

Сва четири тестирана једињења су показала снажно антипролиферативно дејство након 72 часа на малигнућ ћелије сквамозелуларног карцинома језика. Прецизније добијена IC_{50} вредност за комплекс обележен као *Pd1* је износила $5\mu M$. Затим, добијена IC_{50} концентрација за *Pd2* једињење је износила $6\mu M$. Такође, добијене IC_{50} вредности за цисплатину и оксалиплатину су износиле $7\mu M$ и $6\mu M$.

Према јасно добијеним IC_{50} вредностима тестираних једињења можемо са сигурношћу рећи да је са повећањем инкубационог периода демонстриран и снажнији антипролиферативни ефекат. Уколико погледамо детаљно добијене IC_{50} вредности можемо закључити да је комплекс *Pd1* демонстрирао најснажнији антипролиферативни ефекат. Прецизније, ово тестирано једињење је имало мање IC_{50} вредности у односу на преостала три тестирана једињења. Једињења обележена као *Pd2* и оксалиплатина су испољила снажнији антипролиферативни ефекат од цисплатине. Међутим, јасно је показано да сва четири тестирана једињења испољавају снажан антипролиферативни ефекат на ћелије сквамозелуларног карцинома језика.

Следећи корак у тестирању потенцијалних антитуморских лекова је испитивање антипролиферативног ефекта тестираних једињења на малигнућ незмењене ћелије, а све у циљу јасног дефинисања степена селективности.

Наша студија је испитивала антипролиферативни ефекат једињења паладијума *Pd1* и *Pd2* на ћелије фибробласта *MRC-5*. Након 24 часа инкубације израчуната IC_{50} вредност за *Pd1* једињење је износила $184\mu M$, чиме је тестирани комплекс демонстрирао веома слаб антипролиферативни ефекат на фибробласте. Даље, комплекс *Pd2* је такође демонстрирао веома слаб антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије при чему је IC_{50} вредност износила $151\mu M$. Лекови цисплатина и оксалиплатина су показале веома слаб антипролиферативни ефекат након 24 часа инкубације добијене IC_{50} вредности су износиле $108\mu M$ и $102\mu M$.

Након 48 часова инкубације оба тестирана једињења су демонстрирала веома слаб антипролиферативни ефекат на *MRC-5* ћелије. Добијена IC_{50} концентрација за једињење обележено као *Pd1* је износила $87\mu M$, док је израчуната IC_{50} вредност за *Pd2* комплекс износила $74\mu M$. Контролни лекови, цисплатина и оксалиплатина су показали умерен антипролиферативни ефекат на фибробласте, при чему су израчунате IC_{50} вредности износиле $46\mu M$ и $34\mu M$.

Тестирана једињења паладијума су демонстрирала изузетно слаб антипролиферативни ефекат на фибробласте након 72h инкубације. Израчуната IC_{50} концентрација за *Pd1* једињење је износила $68\mu M$, док је добијена IC_{50} вредност за *Pd2* једињење износила $78\mu M$. Даље, цисплатина и оксалиплатина су показали умерен антипролиферативни ефекат на *MRC-5* ћелије након 72h инкубације, при чему су добијене IC_{50} вредности износиле $27\mu M$ и $25\mu M$.

Ако погледамо претходно поменуте IC_{50} вредности можемо јасно утврдити да тестирана једињења паладијума показују значајан степен селективности у сва три временска интервала. За разлику од *Pd1* и *Pd2* једињења, контролни лекови (цисплатина и оксалиплатина) су демонстрирали снажнији антипролиферативни ефекат у односу на тестирана једињења паладијума.

Комплекси метала представљају будућност антиканцерске терапије због својих хемијских особина. У различитим *in vitro* тестирањима једињења цинка, рутенијума, злата, бакра су демонстрирала веома снажан антипролиферативни ефекат на великом броју различитих малигнућних ћелијских линија (249). Такође, поједини комплекси рутенијума су ушли у клиничка испитивања и демонстрирали висок степен селективности (250). Једињења паладијума су се веома добро показала у истраживањима *in vitro*. Демонстриран је висок степен селективности као и снажан антиканцерски ефекат (239).

Истраживање публиковано од стране *Juribasic* и сарадника демонстрирало је да паладијум једињења показују снажан антипролиферативни ефекат на четири канцерске ћелије, карцином колоне *SW 620* и *HCT 116*, карцином плућа *H 460*, карцином дојке *MCF-7*, Т-лимфобластна леукемија *MOLT4*. Израчунате IC_{50} вредности ове студије су износиле од $5\mu M$ до $15\mu M$, при чему антипролиферативни ефекат паладијум једињења није тестиран на малигно неизмењене ћелије (240). Такође, наша студија је јасно демонстрирала снажан антипролиферативни ефекат на канцерској ћелијској линији, са сличним IC_{50} вредностима, $5\mu M$ и $6\mu M$. Иако студије нису рађене на истим ћелијским линијама, можемо закључити да наши паладијум комплекси показују сличан биолошки ефекат као и једињења синтетисана од стране Јурибашић и сарадника.

Када говоримо о једињењима паладијума, истраживање спроведено од стране *Simic* и сарадника је демонстрирало да комплексни имају веома јак антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате. Добијене IC_{50} вредности ове студије су износиле између $6\mu M$ и $17\mu M$. Даље, једињења су показала изузетно висок степен селекције (изузетно слабо антиканцерско дејство на фибробласте), при чему су IC_{50} вредности износиле између $152\mu M$ и $200\mu M$. Тестирани су и одговарајући лиганди који су показали изузетно слаб антипролиферативни ефекат на *PC-3* ћелије, чиме је доказана важност присуства метала *Pd* (239). У поређењу са нашом студијом можемо рећи да је сличан антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије показан од стране *Pd1* и *Pd2* једињења, мада важно је напоменути да наше истраживање није спроведено на истим ћелијским линијама. Такође, у нашој студији нису тестирани одговарајући лиганди. Слично, и у нашем истраживању је показан умерен антипролиферативни ефекат на фибробласте чиме смо доказали селективност тестираних једињења.

Већина синтетисаних једињења паладијума од стране *Pruchnik* и сарадника су показала умерен антипролиферативни ефекат на ћелије малигног меланома *SK-mel*, *SH-4*, *Colo-829*, *C-32* и ћелије карцинома дојке *MCF7*, *T-47D* и *MDA-MB-231*. Добијене IC_{50} вредности ове студије су износиле од $8\mu M$ до $190\mu M$. Такође у овом истраживању није тестиран антипролиферативни ефекат једињења паладијума на малигно неизмењене ћелије (241). За разлику од претходно поменуте студије, у нашем истраживању једињења паладијума *Pd1* и *Pd2* су демонстрирала знатно снажнији антипролиферативни ефекат на малигне ћелије, али треба напоменути да није рађена *in vitro* студија на истим ћелијским линијама. Такође, наша студија је обухватила тестирање паладијум једињења на малигно неизмењене ћелије.

Серија синтетисаних паладијум једињења од стране *Li* и сарадника демонстрирала су јако антипролиферативно дејство на три канцерске ћелијске линије, карцином дојке *MCF-7*, карцином плућа *A549* и карцином цервикса *HeLa*. Израчунате IC_{50} вредности су износиле од $1\mu M$ до $37\mu M$ (242). Ипак, студија није обухватила тестирање серије комплекса на малигно неизмењене ћелије. Можемо рећи да су веома сличан антипролиферативни ефекат показала и наша тестирана једињења, при чему је наша студија обухватила и тестирање биолошке активности комплекса на фибробласте.

Публикован рад од стране *Joksimovic* и сарадника обухватио је тестирање једињења паладијума на две малигне ћелијске линије, карцином дојке *MDA-MB-231* и карцином цервикса *HeLa*. Показан је снажан антипролиферативни ефекат, што је слично показано и у нашој студији, али истраживања нису спроведена на истим ћелијским линијама. Такође у студији *Joksimovic* и сарадника показан је висок степен селективности тестираних једињења, при чему је демонстриран изузетно слабо антипролиферативно дејство на фибробласте што је у корелацији са нашом студијом (243).

Студија спроведена од стране *Kharat* и сарадника је демонстрирало да три комплекса показују умерено антипролиферативно дејство на ћелије карцинома дојке *MCF-7*, *MC4L2* и *4 T1*. Добијене IC_{50} вредности ове студије су износиле између $20\mu M$ и $100\mu M$, при чему су IC_{50} вредности наше студије добијене у нашој студији нешто ниже и износе $6\mu M$ и $7\mu M$ (251). Можемо закључити да су наша синтетисана једињења испољила нешто јачи антитуморски ефекат, али комплексни нису тестирани на истим ћелијским линијама. Такође, за разлику од претходно поменутог истраживања у наше истраживање је обухватило антипролиферативни ефекат на фибробласте.

Студија спроведена од стране *Svoboda* и сарадника је обухватило тестирање три паладијум једињења на ћелијске линије *RAW*, *HeLa*, *HOC* и *HL-60*. Сва три једињења су

демонстрирала веома снажан антипролиферативни ефекат на малигно измењене ћелије, при чему су IC_{50} вредности су износиле од $1\mu M$ до $40\mu M$. Такође, тестиран је цитотоксични ефекат једињења паладијума на здраве фибробласте, при чему су добијене су IC_{50} вредности износиле од $5\mu M$ до $16\mu M$ (252). Ове вредности нам јасно указују да три синтетисана комплекса паладијума испољавају снажан антипролиферативни ефекат и на фибробласте, чиме је јасно демонстрирана неселективност. За разлику од претходно поменути студије, у нашем истраживању комплекси паладијума обележени као *Pd1* и *Pd2* показују већи степен селективности, односно знатно мањи антипролиферативни ефекат на контролне, малигно неизмењене ћелије.

Студија *Omondi* и сарадника је тестирала четири једињења паладијума на канцерске ћелијске линије *HeLa* и *MRC5-SV2* (253). Такође, у циљу испитивања степена селективности биолошка активност комплекса је тестирана и на фибробластима, *MRC-5*. У овом истраживању једињења паладијума су испољила снажно антипролиферативно дејство како на канцерске ћелије тако и на малигно неизмењене ћелије. Наша синтетисана једињења паладијума су демострирала знатно већи степен селективности од комплекса синтетисаних у претходној студији.

Потенцијални хемиотерапеутци, једињења метала тестирана у *in vitro* условима могу имати снажан антипролиферативни ефекат захваљујући активацији процеса апоптозе. Такође, велика већина цитостатика који се клинички примењују у терапији малигнитета спречавају убрзану пролиферацију канцерских ћелија активирањем програмиране ћелијске смрти. Међутим, уколико малигна ћелија успе да „избегне“ активирање процеса апоптозе то је најчешће узрокује појаву резистенције на лек.

Тестирано једињење у нашој студији обележено као *Pd1* је демонстрирало снажан антипролиферативни ефекат на *SCC-4* ћелије, при чему је детектовано око 35% ћелија у фази ране апоптозе. Затим 10% се налазило у касној апоптози док се само 5% ћелија налазило у фази некрозе.

Једињење паладијума које смо обележили као *Pd2* је демонстрирало снажан антипролиферативни ефекат *SCC-4* ћелија и детектовано 25% ћелија у фази ране апоптозе, 10% је детектовано у касној фази програмиране ћелијске смрти. Само 8% од тестираних малигнућ ћелија је детектовано у некрози.

Слично нашим резултатима, студија спроведена од стране *Simica* и сарадника је јасно демонстрирала да пет синтетисаних паладијум једињења показују антипролиферативни ефекат на *PC-3* ћелије активацијом процеса програмиране ћелијске смрти. Прецизније око 50% *PC-3* ћелија је детектовано у раној апоптози. Антутуморски ефекат је такође тестиран на *DU-145* ћелије, а највећи проценат ћелија детектован је у раној апоптози (239).

Паладијум једињења тестирана од стране *Valentini* и сарадника су такође испољила антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате *LnCaP*, *PC3*, and *DU145* (254). Снажан антиканцерски ефекат је постигнут покретањем процеса апоптозе, што је у корелацији са нашим истраживањем.

Можемо закључити да једињења паладијума могу активирати процес апоптозе и на тај начин испољити антипролиферативни ефекат на разне канцерске ћелијске линије.

Антипролиферативни ефекат потенцијалних хемиотерапеутика тестираних у *in vitro* може се индуковати на два начина, активирањем апоптотичног пута и застојем у ћелијском циклусу.

Након тестирања једињење обележено као *Pd1* индуковало је застој ћелијског циклуса канцерских ћелија у *S* фази, при чему се активирао процес апоптозе. Такође, можемо рећи да је и комплекс паладијума *Pd1* индуковао застој у *S* фази ћелијског циклуса *SCC-4* ћелија.

Истраживање *Simic* и сарадника је демонстрирало да једињења паладијума могу индуковати застој у ћелијском циклусу, *G₀/G₁*, *S* и *G₂*. Јасно је да ови резултати нису у корелацији са нашим добијеним резултатима (239).

За разлику од нашег истраживања, студија спроведена од стране *Bjelogrlic* и сарадника је демонстрирала да тестирана паладијум једињења доводе до застоја у *G₀/G₁* фази ћелијског циклуса (255).

Резултати *Li* и сарадника су у корелацији са резултатима наше студије, тестирана једињења паладијума су индуковала застој у *S* фази ћелијског циклуса (242).

Из свега претходно наведеног можемо рећи да комплексни паладијум могу индуковати застој у свим фазама ћелијског циклуса при чему се покреће и активира апоптотични процес.

Есенцијалну, регулаторну улогу каскадној активацији процеса програмиране ћелијске смрти имају регулаторни протеини проапоптотски и антиапоптотски, од чије концентрације директно зависи да ли ће доћи до апоптозе или ћелијске пролиферације. Многи биолошки активни комплекси који у својој структури имају метал могу повећати унутар малигне ћелије концентрацију проапоптотског *Bax* протеина и истовремено смањити концентрацију антиапоптотског *Bcl-2*. Јасно је да све ово за последицу има поремећај односа концентрације *Bcl-2/Bax* протеина, што резултује активирањем митохондријалног пута. Кључну улогу у митохондријалном путу има егзекуторска каспаза-3 (239).

У нашој студији је детектован значајан пораст концентрације проапоптотског протеина *Bax* код ћелија сквамозног каринома језика *SCC-4* након третмана малигнућ ћелија *Pd1* комплексом. Насупрот томе, јасно је детектован пад концентрације антиапоптотског *Bcl-2* протеина. Стога, условљено је смањење односа *Bcl-2/Bax* протеина и активација митохондријалног пута. Да је дошло до активације митохондријалног пута демонстрира нам детектована повећана концентрација егзекуторске каспазе-3.

Такође, након третмана *SCC-4 Pd2* комплексом дошло је до пораста експресије *Bax* протеина као и значајног смањења експресије *Bcl-2* протеина. Јасно је да и тестирано *Pd2* једињење узрокује пад односа *Bcl-2/Bax* протеина и активацију унутрашњег апоптотичног пута. Услед смањеног односа *Bcl-2/Bax* протеина дошло је и до детекције, пораста концентрације каспазе-3.

Студије које су се бавиле антитуморским активностима паладијум комплекса такође су показале да је у основи антипролиферативне активности заправо поремећај

односа *Bcl-2/Bax*, активација митохондријалног пута. Поред тога, детектована је и повећана концентрација реактивних кисеоничних врста код тестираних малигнух ћелија (239).

На основу свега претходно поменутог можемо рећи да су једињења *Pd1* и *Pd2* демонстрирала веома снажан антипролиферативни ефекат индукујући ћелијски застој при чему је дошло до активације митохондријалног пута апоптозе *SCC-4* ћелија. Поред тога, цитотоксични ефекат је био значајно слабији на фибробластима.

6. ЗАКЉУЧАК

6.1. ГЛАВНИ ЗАКЉУЧАК

Резултати нашестудије су демонстрирали да синтетисани комплекси паладијума, Pd1 и Pd2 делују цитотоксично на ћелије сквамозелуларног карцинома језика SCC-4, а имају слабо цитотоксично дејство на испитиваној контролној популацији, фибробласти. Доказано је и да ови комплекси умањују вијабилност канцерских ћелија покретањем апоптозе, као доминантним типом ћелијске смрти који настаје услед њиховог дејства, чиме селективно и локализовано делују искључиво на малигно измењене ћелије. Поред тога, Pd1 и Pd2 утичу на релативни однос проапоптотичног протеина bax и антиапоптотичног bcl-2 протеина код тестираних ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4 тако што повећавају проценат активног проапоптотичног протеина bax и смањују количину антиапоптотичног протеина bcl-2. Закључак је да ови комплекси индукују апоптозу активацијом унутрашњег, односно митохондријалног пута апоптозе. Такође, Pd1 и Pd2 повећавају процентуално број ћелија које емитују флуоресценцу на каспазу-3 што значи да је апоптоза туморских ћелија која се индукује њиховим дејством последица активности каскаде каспаза. На тај начин, наши новосинтетисани комплекси паладијума(II), Pd1 и Pd2 директно смањују бројност туморских ћелија.

Поред наведеног, показано је и да ови комплекси заустављају ћелијски циклус туморских ћелија хуманог сквамозелуларног карцинома језика SCC-4 чиме се успорава пролиферација туморских ћелија, односно успорава даља прогресија тумора. Тиме, заустављањем ћелијског циклуса ћелија сквамозелуларног карцинома, наши новосинтетисани комплекси паладијума(II), Pd1 и Pd2 могу и индиректно индуковати апоптозу.

6.2. ОСТАЛИ ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведеног истраживања можемо да закључимо следеће:

1. Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$ делују цитотоксично на ћелије сквамозелуларног карцинома језика SCC-4.
2. Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$ имају слабо цитотоксично дејство на испитиване, малигно неизмењене ћелије MRC-5 (фибробласти).
3. Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$ смањују вијабилност туморских ћелија тако што доминантно индукују процес програмиране ћелијске смрти, односно индукцијом апоптозе ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4.
4. Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$ заустављају ћелијски циклус ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4.
5. Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pz))(ClO_4)_4$ и Pd2 - $([Pd(diem)]_2(\mu-pydz))(ClO_4)_4$ утичу на релативни однос проапоптотичног протеина bax и антиапоптотичног bcl-2 протеина код испитиваних ћелија сквамозелуларног карцинома језика SCC-4 тако што повећавају проценат активног проапоптотичног протеина bax и смањују количину антиапоптотичног протеина bcl-2.

6. Новосинтетисани динуклеарни комплекси паладијума(II): Pd1 - $([\text{Pd}(\text{diem})]_2(\mu\text{-pz}))(\text{ClO}_4)_4$ и Pd2 - $([\text{Pd}(\text{diem})]_2(\mu\text{-pydz}))(\text{ClO}_4)_4$ повећавају проценат ћелија које емитују флуоресценцу на активну каспазу-3.

7. ЛИТЕРАТУРА

РЕФЕРЕНЦЕ

1. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021;246(16):1791-1801.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*. Data status, Beograd. 2005
3. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217-22.
4. Janković SM. *Farmakologija i toksikologija*, 2011. Medicinski fakultet, Kragujevac.
5. Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev*. 2020;34(5-6):360-94.
6. Luo Y, Ma J, Lu W. The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):5598.
7. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan; 2008.
8. Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021;125:73-120.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
10. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*. 2021;149(4):778-89.
11. Liput KP, Lepczyński A, Ogłuszka M, Nawrocka A, Poławska E, Grzesiak A, Ślaska B, Pareek CS, Czarnik U, Pierzchała M. Effects of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammation and Cancerogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6965.
12. Valko-Rokytkovská M, Očenáš P, Salayová A, Kostecká Z. Breast Cancer: Targeting of Steroid Hormones in Cancerogenesis and Diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2021;30;22(11):5878.
13. Grubelnik G, Boštjančič E, Pavlič A, Kos M, Zidar N. NANOG expression in human development and cancerogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020;245(5):456-64
14. Shen S, Vagner S, Robert C. Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. *Cell*. 2020;183(4):860-74.
15. Groelly FJ, Fawkes M, Dagg RA, Blackford AN, Tarsounas M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2023;23(2):78-94.
16. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-78.
17. Huang R, Zhou PK. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):254.
18. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, Vakili-Azghandi M, Avan A, Sandry R, Pillai S, Lam AK, Gopalan V. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5741-50

19. Desjonqueres E, Campani C, Marra F, Zucman-Rossi J, Nault JC. Preneoplastic lesions in the liver: Molecular insights and relevance for clinical practice. *Liver Int.* 2022;42(3):492-506.
20. Eddy K, Shah R, Chen S. Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Front Oncol.* 2021;10:626129.
21. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. *Harrison's principles of internal medicine, 19e.* New York, NY, USA:: Mcgraw-hill; 2015.
22. Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, Lee S, Coffey DG, Holmberg LA, Tuazon S, Gopal AK, Libby EN. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA.* 2022;327(5):464-77.
23. Gluba-Brzózka A, Rysz J, Ławiński J, Franczyk B. Renal Cell Cancer and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6):3404.
24. Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6806.
25. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, Kshitiz. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* 2019;9(2):109-127.
26. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):125.
27. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther.* 2021;221:107753.
28. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(10):669-80.
29. Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells.* 2019;8(8):854.
30. Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Dev Cell.* 2019;49(3):347-60.
31. Tang Q, Su Z, Gu W, Rustgi AK. Mutant p53 on the Path to Metastasis. *Trends Cancer.* 2020;6(1):62-73.
32. Manchester KL. Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. *Trends Cell Biol.* 1995;5(10):384-7.
33. Jurcă MC, Ivaşcu ME, Jurcă AA, Kozma K, Magyar I, Şandor MI, Jurcă AD, Zaha DC, Albu CC, Pantiş C, Bembea M, Petchiş CD. Genetics of congenital solid tumors. *Rom J Morphol Embryol.* 2020;61(4):1039-49.
34. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.* 2020;40(11):6009-15.
35. Fasoulakis Z, Daskalakis G, Diakosavvas M, Papapanagiotou I, Theodora M, Bourazan A, Alatzidou D, Pagkalos A, Kontomanolis EN. MicroRNAs Determining Carcinogenesis by

- Regulating Oncogenes and Tumor Suppressor Genes During Cell Cycle. *Microna*. 2020;9(2):82-92
36. Thandapani P. Super-enhancers in cancer. *Pharmacol Ther*. 2019;199:129-138.
37. Stapelfeld C, Dammann C, Maser E. Sex-specificity in lung cancer risk. *Int J Cancer*. 2020;146(9):2376-82.
38. Chen S, Li F, Xu D, Hou K, Fang W, Li Y. The Function of RAS Mutation in Cancer and Advances in its Drug Research. *Curr Pharm Des*. 2019;25(10):1105-14.
39. Brosseau JP, Le LQ. Heterozygous Tumor Suppressor Microenvironment in Cancer Development. *Trends Cancer*. 2019;5(9):541-46.
40. Michels BE, Mosa MH, Streibl BI, Zhan T, Menche C, Abou-El-Ardat K, Darvishi T, Członka E, Wagner S, Winter J, Medyouf H, Boutros M, Farin HF. Pooled In Vitro and In Vivo CRISPR-Cas9 Screening Identifies Tumor Suppressors in Human Colon Organoids. *Cell Stem Cell*. 2020;26(5):782-792.e7.
41. Setton J, Zinda M, Riaz N, Durocher D, Zimmermann M, Koehler M, Reis-Filho JS, Powell SN. Synthetic Lethality in Cancer Therapeutics: The Next Generation. *Cancer Discov*. 2021;11(7):1626-35
42. Wood RD, Doublé S. Genome Protection by DNA Polymerase θ . *Annu Rev Genet*. 2022;56:207-228.
43. Weaver TM, Washington MT, Freudenthal BD. New insights into DNA polymerase mechanisms provided by time-lapse crystallography. *Curr Opin Struct Biol*. 2022 Dec;77:102465.
44. Douglass J, Hsiue EH, Mog BJ, Hwang MS, DiNapoli SR, Pearlman AH, Miller MS, Wright KM, Azurmendi PA, Wang Q, Paul S, Schaefer A, Skora AD, Molin MD, Konig MF, Liu Q, Watson E, Li Y, Murphy MB, Pardoll DM, Bettgowda C, Papadopoulos N, Gabelli SB, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhou S. Bispecific antibodies targeting mutant RAS neoantigens. *Sci Immunol*. 2021 Mar 1;6(57):eabd5515.
45. Nyga A, Ganguli S, Matthews HK, Baum B. The role of RAS oncogenes in controlling epithelial mechanics. *Trends Cell Biol*. 2023;33(1):60-9.
46. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022;29(5):946-60.
47. Huang Y, Yi Q, Feng J, Xie W, Sun W, Sun W. The role of lincRNA-p21 in regulating the biology of cancer cells. *Hum Cell*. 2022;35(6):1640-49.
48. Niu Z, Zhang W, Shi J, Li X, Wu H. Effect of silencing C-erbB-2 on esophageal carcinoma cell biological behaviors by inhibiting IGF-1 pathway activation. *J Cardiothorac Surg*. 2021;16(1):194.
49. Singh S, Singh NK, Singh S. Breast-Cancer Biomarker (C-erbB-2) Detection in Saliva/Serum Based on In1-xGaxAs/Si Hetero Junction Dopingless TFET Biosensor. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2022;PP.
50. Szyszka M, Paschke L, Tyczewska M, Jopek K, Celichowski P, Milecka P, Sultanova G, Stelcer E, Malinska A, Malendowicz LK, Rucinski M. Analysis of Transcriptome, Selected

Intracellular Signaling Pathways, Proliferation and Apoptosis of LNCaP Cells Exposed to High Leptin Concentrations. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5412.

51. Yuan Z, Dewson G, Czabotar PE, Birkinshaw RW. VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochem Soc Trans.* 2021;49(6):2787-95.

52. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(3):177.

53. Feng M, Xie X, Han G, Zhang T, Li Y, Li Y, Yin R, Wang Q, Zhang T, Wang P, Hu J, Cheng Y, Gao Z, Wang J, Chang J, Cui M, Gao K, Chai J, Liu W, Guo C, Li S, Liu L, Zhou F, Chen J, Zhang H. YBX1 is required for maintaining myeloid leukemia cell survival by regulating BCL2 stability in an m6A-dependent manner. *Blood.* 2021;138(1):71-85.

54. Ma J, Zhao S, Qiao X, Knight T, Edwards H, Polin L, Kushner J, Dzinic SH, White K, Wang G, Zhao L, Lin H, Wang Y, Taub JW, Ge Y. Inhibition of Bcl-2 Synergistically Enhances the Antileukemic Activity of Midostaurin and Gilteritinib in Preclinical Models of FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2019 Nov 15;25(22):6815-826.

55. Jin L, Chen Y, Cheng D, He Z, Shi X, Du B, Xi X, Gao Y, Guo Y. YAP inhibits autophagy and promotes progression of colorectal cancer via upregulating Bcl-2 expression. *Cell Death Dis.* 2021;12(5):457.

56. Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. *Cells.* 2021;10(1):117.

57. Osman AEG, Deininger MW. Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Rev.* 2021 Sep;49:100825.

58. Asnafi AA, Deris Zayeri Z, Shahrabi S, Zibara K, Vosughi T. Chronic myeloid leukemia with complex karyotypes: Prognosis and therapeutic approaches. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5798-806.

59. Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, DeAngelo DJ, Gotlib J, Hobbs G, Maness L, Mead M, Metheny L, Mohan S, Moore JO, Naqvi K, Oehler V, Pallera AM, Patnaik M, Pratz K, Pusic I, Rose MG, Smith BD, Snyder DS, Sweet KL, Talpaz M, Thompson J, Yang DT, Gregory KM, Sundar H. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2020;18(10):1385-415.

60. Manrique M, Akinbolue D, Madigan WP, Bregman J. Update on the Treatment of Retinoblastoma. *Neoreviews.* 2021 Jul;22(7):e423-e437.

61. Martínez-Sánchez M, Hernandez-Monge J, Rangel M, Olivares-Illana V. Retinoblastoma: from discovery to clinical management. *FEBS J.* 2022;289(15):4371-82.

62. Agupitan AD, Neeson P, Williams S, Howitt J, Haupt S, Haupt Y. P53: A Guardian of Immunity Becomes Its Saboteur through Mutation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):3452.

63. Zhang C, Liu J, Xu D, Zhang T, Hu W, Feng Z. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. *J Mol Cell Biol.* 2020;12(9):674-87.

64. Kennedy MC, Lowe SW. Mutant p53: it's not all one and the same. *Cell Death Differ.* 2022;29(5):983-87.

65. Guiley KZ, Shokat KM. A Small Molecule Reacts with the p53 Somatic Mutant Y220C to Rescue Wild-type Thermal Stability. *Cancer Discov.* 2023;13(1):56-69.
66. Gargallo P, Yáñez Y, Segura V, Juan A, Torres B, Balaguer J, Oltra S, Castel V, Cañete A. Li-Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clin Transl Oncol.* 2020;22(7):978-88.
67. Schneider K, Zelle K, Nichols KE, Garber J. Li-Fraumeni Syndrome. 1999 Jan 19 [updated 2019 Nov 21]. In: Adam MP, Mirzazadeh GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.
68. Wang C, Lin Y, Zhu H, Zhou Y, Mao F, Huang X, Zhou X, Cao X, Sun Q. Breast-conserving therapy for breast cancer with BRCA mutations: a meta-analysis. *Breast Cancer.* 2022.
69. Lee A, Moon BI, Kim TH. BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Ann Lab Med.* 2020;40(2):114-121.
70. Nagy ND, Fazekas T, Baghy K, Papp G, Csizmarik A, Szűcs M, Nyirády P, Szarvas T. A karboplatin-kemoterápia hatékonysága egy áttétes, kasztrációrezisztens, BRCA2-mutáció-pozitív prosztatarákos betegben [Efficacy of carboplatin chemotherapy in a metastatic, castration-resistant BRCA2 mutation positive prostate cancer patient]. *Orv Hetil.* 2021;162(25):1004-8.
71. Gruber JJ, Afghahi A, Timms K, DeWees A, Gross W, Aushev VN, Wu HT, Balcioglu M, Sethi H, Scott D, Foran J, McMillan A, Ford JM, Telli ML. A phase II study of talazoparib monotherapy in patients with wild-type BRCA1 and BRCA2 with a mutation in other homologous recombination genes. *Nat Cancer.* 2022;3(10):1181-91.
72. An Y, Duan H. The role of m6A RNA methylation in cancer metabolism. *Mol Cancer.* 2022;21(1):14.
73. Zaib S, Rana N, Khan I. Histone Modifications and their Role in Epigenetics of Cancer. *Curr Med Chem.* 2022;29(14):2399-411.
74. Thakur C, Chen F. Connections between metabolism and epigenetics in cancers. *Semin Cancer Biol.* 2019;57:52-8.
75. Liu Y, Chen C, Wang X, Sun Y, Zhang J, Chen J, Shi Y. An Epigenetic Role of Mitochondria in Cancer. *Cells.* 2022;11(16):2518.
76. Wen S, Wei Y, Zen C, Xiong W, Niu Y, Zhao Y. Long non-coding RNA NEAT1 promotes bone metastasis of prostate cancer through N6-methyladenosine. *Mol Cancer.* 2020;19(1):171.
77. Oakes SA. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *Am J Pathol.* 2020 May;190(5):934-46.
78. White-Gilbertson S, Kurtz DT, Voelkel-Johnson C. The role of protein synthesis in cell cycling and cancer. *Mol Oncol.* 2009;3(5-6):402-8.
79. Baba AI, Cătoi C. *Comparative Oncology*. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; 2007. Chapter 3, TUMOR CELL MORPHOLOGY.
80. Huang, J., Zhang, L., Wan, D. et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. doi.org/10.1038/s41392-021-00544-0.

81. Khan T, Waseem R, Zehra Z, Aiman A, Bhardwaj P, Ansari J, Hassan MI, Islam A. Mitochondrial Dysfunction: Pathophysiology and Mitochondria-Targeted Drug Delivery Approaches. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2657.
82. Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*. 2012;2012:137289.
83. Clemente SM, Martínez-Costa OH, Monsalve M, Samhan-Arias AK. Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. *Molecules*. 2020; 25(21):5144.
84. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett*. 2019 May;17(5):4213-21.
85. Cossu, V., Bonanomi, M., Bauckneht, M. et al. Two high-rate pentose-phosphate pathways in cancer cells. doi.org/10.1038/s41598-020-79185-2.
86. Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis*. 2017;4(1):25-27.
87. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211-18.
88. Yu L., Chen X., Wang L., Chen S. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*. 2016; 7: 38908-26.
89. Atanacković M et al. *Patologija*, 2022. Medicinski fakultet Beograd.
90. Szlasa W, Zendran I, Zalesińska A, Tarek M, Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 2020 Oct;52(5):321-42.
91. Lin TC, Yang CH, Cheng LH, Chang WT, Lin YR, Cheng HC. Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells*. 2019;9(1):27.
92. Ramos Gde O, Bernardi L, Lauxen I, Sant'Ana Filho M, Horwitz AR, Lamers ML. Fibronectin Modulates Cell Adhesion and Signaling to Promote Single Cell Migration of Highly Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151338.
93. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
94. Wong, R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. doi.org/10.1186/1756-9966-30-87.
95. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.
96. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 ;20(3):175-193
97. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):151-64.
98. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jan;63(1):60-72.
99. Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Nov;21(11):678-95.

100. Kist M, Vucic D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J.* 2021;40(5):e106700.
101. Morgan MJ, Liu ZG. Programmed cell death with a necrotic-like phenotype. *Biomol Concepts.* 2013 Jun;4(3):259-75.
102. Peng F, Liao M, Qin R, Zhu S, Peng C, Fu L, Chen Y, Han B. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):286.
103. Datta A, Sarmah D, Mounica L, Kaur H, Kesharwani R, Verma G, Veeresh P, Kotian V, Kalia K, Borah A, Wang X, Dave KR, Yavagal DR, Bhattacharya P. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Transl Stroke Res.* 2020;11(6):1185-202.
104. Adjemian S, Oltean T, Martens S, Wiernicki B, Goossens V, Vanden Berghe T, Cappe B, Ladik M, Riquet FB, Heyndrickx L, Bridelance J, Vuylsteke M, Vandecasteele K, Vandenabeele P. Ionizing radiation results in a mixture of cellular outcomes including mitotic catastrophe, senescence, methuosis, and iron-dependent cell death. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):1003.
105. Alu A, Han X, Ma X, Wu M, Wei Y, Wei X. The role of lysosome in regulated necrosis. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Oct;10(10):1880-1903. doi: 10.1016/j.apsb.2020.07.003. Epub 2020 Jul 13.
106. Moserova I, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS One.* 2012;7(3):e32972.
107. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jan;129(1):33-43. doi: 10.1007/s00418-007-0356-9. Epub 2007 Nov 14
108. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* 2018;28(1):9-21.
109. Hu XM, Li ZX, Lin RH, Shan JQ, Yu QW, Wang RX, Liao LS, Yan WT, Wang Z, Shang L, Huang Y, Zhang Q, Xiong K. Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:634690.
110. Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Lüder CG, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors.* 2010;3:104.
111. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis.* 2022 Aug;27(7-8):482-508.
112. Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):166-80.
113. Elliott MR, Ravichandran KS. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev Cell.* 2016 Jul 25;38(2):147-60.
114. Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, Vandenabeele P. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* 2006;13(12):2011-22.

115. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol.* 2015 Sep;16(9):907-17.
116. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull.* 1997;53(3):491-508.
117. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a008748.
118. Han CZ, Ravichandran KS. Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell.* 2011;147(7):1442-5.
119. Bonora M, Giorgi C, Pinton P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Apr;23(4):266-285.
120. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582-92.
121. Tonnus W, Meyer C, Paliege A, Belavgeni A, von Mässenhausen A, Bornstein SR, Hugo C, Becker JU, Linkermann A. The pathological features of regulated necrosis. *J Pathol.* 2019 Apr;247(5):697-707. doi: 10.1002/path.5248.
122. Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu MN, Haegeman G, D'Herde K, Vandenameele P. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1089-100.
123. Jan R, Chaudhry GE. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205-18.
124. Cavalcante, G.C.; Schaan, A.P.; Cabral, G.F.; Santana-da-Silva, M.N.; Pinto, P.; Vidal, A.F.; Ribeiro-dos-Santos, Â. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. doi.org/10.3390/ijms20174133.
125. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, Anel A, Simon MM. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004 Nov 8;167(3):457-68.
126. Waterhouse NJ, Sutton VR, Sedelies KA, Ciccone A, Jenkins M, Turner SJ, Bird PI, Trapani JA. Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *J Cell Biol.* 2006 Apr 10;173(1):133-44.
127. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel).* 2020 Jan 20;9(1):21.
128. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res.* 2021;31(2):107-25.
129. Woo SM, Kwon TK. E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases as modulators of TRAIL-mediated extrinsic apoptotic signaling pathway. *BMB Rep.* 2019;52(2):119-26.
130. Oh YT, Sun SY. Regulation of Cancer Metastasis by TRAIL/Death Receptor Signaling. *Biomolecules.* 2021 Mar 26;11(4):499.
131. Leytin V, Gyulkhandanyan AV, Freedman J. Platelet Apoptosis Can Be Triggered Bypassing the Death Receptors. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019;25:1076029619853641.

132. Lovejoy EA, Clarke AR, Harrison DJ. Animal models and the molecular pathology of cancer. *J Pathol.* 1997;181(2):130-5.
133. Imran M, Aslam Gondal T, Atif M, Shahbaz M, Batoool Qaisarani T, Hanif Mughal M, Salehi B, Martorell M, Sharifi-Rad J. Apigenin as an anticancer agent. *Phytother Res.* 2020;34(8):1812-28.
134. Volpe E, Sambucci M, Battistini L, Borsellino G. Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2016;7:382.
135. Ruiz A, Palacios Y, Garcia I, Chavez-Galan L. Transmembrane TNF and Its Receptors TNFR1 and TNFR2 in Mycobacterial Infections. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5461.
136. Vigneswara V, Ahmed Z. The Role of Caspase-2 in Regulating Cell Fate. *Cells.* 2020;9(5):1259.
137. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):26-35.
138. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009 Jun;23(6):1625-37. doi: 10.1096/fj.08-111005. Epub 2009 Jan 13. PMID: 19141537; PMCID: PMC2698650.
139. Tsuchiya Y, Nakabayashi O, Nakano H. FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci.* 2015 Dec 18;16(12):30321-41. doi: 10.3390/ijms161226232. PMID: 26694384; PMCID: PMC4691174.
140. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, Ring HZ, Francke U, Reed JC, Kinoshita S, Nolan GP. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity.* 1998;8(4):461-71.
141. Song Y, Jacob CO. The mouse cell surface protein TOSO regulates Fas/Fas ligand-induced apoptosis through its binding to Fas-associated death domain. *J Biol Chem.* 2005;280(10):9618-26.
142. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res.* 2007;17(9):759-71.
143. Nosalova N, Keselakova A, Kello M, Martinkova M, Fabianova D, Pilatova MB. Involvement of Both Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Tridecylpyrrolidine-Diol Derivative-Induced Apoptosis In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14):11696.
144. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:5080843.
145. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(12):2977-92.
146. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia.* 2014 Nov;30(7):513-23.
147. Li B, Hu M, Chen C, Yin H, Deng Y, Li H, Zhang J, He L. Synthesis and antitumor activity of a series of novel N-aryl-5-(2,2,2-trifluoroethoxy)-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-ones derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2022;73:128919.

148. Ismail Z, Dam J, Penny C, de Koning CB, Harmse L. Copper-imidazo[1,2-a]pyridines differentially modulate pro- and anti-apoptotic protein and gene expression in HL-60 and K562 leukaemic cells to cause apoptotic cell death. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2022;1869(1):119160.
149. Duckett CS. IAP proteins: sticking it to Smac. *Biochem J.* 2005;385(Pt 1):e1-2. doi: 10.1042/BJ20041800.
150. Berthelet J, Dubrez L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells.* 2013;2(1):163-87.
151. Yang SH, Chien CM, Lu MC, Lin YH, Hu XW, Lin SR. Up-regulation of Bax and endonuclease G, and down-modulation of Bcl-XL involved in cardiotoxin III-induced apoptosis in K562 cells. *Exp Mol Med.* 2006;38(4):435-44.
152. Zong L, Liang Z. Apoptosis-inducing factor: a mitochondrial protein associated with metabolic diseases—a narrative review. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2023;13(3):609-22.
153. Wei H, Wang H, Wang G, Qu L, Jiang L, Dai S, Chen X, Zhang Y, Chen Z, Li Y, Guo M, Chen Y. Structures of p53/BCL-2 complex suggest a mechanism for p53 to antagonize BCL-2 activity. *Nat Commun.* 2023;14(1):4300.
154. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol.* 2012;2012:524308.
155. Perumalsamy A, Fernandes R, Lai I, Detmar J, Varmuza S, Casper RF, Jurisicova A. Developmental consequences of alternative Bcl-x splicing during preimplantation embryo development. *FEBS J.* 2010;277(5):1219-33.
156. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J.* 2018;285(3):416-31.
157. Prayson RA, Yu AC. Bcl-2, Bcl-x, and Bax expression by immunohistochemistry in inclusion body myositis: a study of 27 cases. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Oct;125(10):1326-30. doi: 10.5858/2001-125-1326-BBXABE.
158. Koenig MN, Naik E, Rohrbeck L, Herold MJ, Trounson E, Bouillet P, Thomas T, Voss AK, Strasser A, Coultas L. Pro-apoptotic BIM is an essential initiator of physiological endothelial cell death independent of regulation by FOXO3. *Cell Death Differ.* 2014;21(11):1687-95.
159. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275(5303):1129-32.
160. Wang J, Thomas HR, Li Z, Yeo NCF, Scott HE, Dang N, Hossain MI, Andrabi SA, Parant JM. Puma, noxa, p53, and p63 differentially mediate stress pathway induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2021;12(7):659.
161. Shibue T, Suzuki S, Okamoto H, Yoshida H, Ohba Y, Takaoka A, Taniguchi T. Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. *EMBO J.* 2006;25(20):4952-62.
162. Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(9-10):1301-11.

163. Spitz AZ, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends Pharmacol Sci.* 2022;43(3):206-20.
164. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, Savardashtaki A. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem.* 2022;69(4):1633-45.
165. Kalkavan H, Chen MJ, Crawford JC, Quarato G, Fitzgerald P, Tait SWG, Goding CR, Green DR. Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells. *Cell.* 2022;185(18):3356-3374.e22.
166. Han JH, Tweedell RE, Kanneganti TD. Evaluation of Caspase Activation to Assess Innate Immune Cell Death. *J Vis Exp.* 2023;(191):10.3791/64308.
167. Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol.* 2019 May;20(5):527-33.
168. Zheng D, Kern L, Elinav E. The NLRP6 inflammasome. *Immunology.* 2021;162(3):281-89.
169. Liu L, Chen M, Lin K, Xiang X, Zheng Y, Zhu S. Inhibiting Caspase-12 Mediated Inflammasome Activation protects against Oxygen-Glucose Deprivation Injury in Primary Astrocytes. *Int J Med Sci.* 2020;17(13):1936-45.
170. Markiewicz A, Sigorski D, Markiewicz M, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Caspase-14-From Biomolecular Basics to Clinical Approach. A Review of Available Data. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5575.
171. Van Opendenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019 Jun 18;50(6):1352-1364. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.020. PMID: 31216460; PMCID: PMC6611727.
172. Velotti F, Barchetta I, Cimini FA, Cavallo MG. Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. *Front Immunol.* 2020;11:587581.
173. Zhou Z, He H, Wang K, Shi X, Wang Y, Su Y, Wang Y, Li D, Liu W, Zhang Y, Shen L, Han W, Shen L, Ding J, Shao F. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science.* 2020;368(6494):eaaz7548.
174. Wang RA, Li QL, Li ZS, Zheng PJ, Zhang HZ, Huang XF, Chi SM, Yang AG, Cui R. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med.* 2013;17(1):205-11.
175. Čanović P, Simović AR, Radisavljević S, Bratsos I, Demitri N, Mitrović M, Zelen I, Bugarčić ŽD. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem.* 2017;22(7):1007-28.
176. Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues. *Apoptosis.* 2023;28(7-8):943-957.
177. Mehrbod P, Ande SR, Alizadeh J, Rahimizadeh S, Shariati A, Malek H, Hashemi M, Glover KKM, Sher AA, Coombs KM, Ghavami S. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence.* 2019;10(1):376-413.

178. Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death Differ.* 2021;28(7):2029-44.
179. Tomita T. Apoptosis of pancreatic β -cells in Type 1 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017 Aug 20;17(3):183-93.
180. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009 May;40(5):e331-9.
181. Teringova E, Tousek P. Apoptosis in ischemic heart disease. *J Transl Med.* 2017 May 1;15(1):87. doi: 10.1186/s12967-017-1191-y. PMID: 28460644; PMCID: PMC5412049.
182. Korshunova AY, Blagonravov ML, Neborak EV, Syatkin SP, Sklifasovskaya AP, Semyatov SM, Agostinelli E. BCL2-regulated apoptotic process in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *Int J Mol Med.* 2021;47(1):23-36.
183. Sun Y, Liu Y, Ma X, Hu H. The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6923.
184. Wang Z. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2022;2579:3-23.
185. Schade AE, Fischer M, DeCaprio JA. RB, p130 and p107 differentially repress G1/S and G2/M genes after p53 activation. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(21):11197-11208.
186. Zhu X, Raina AK, Smith MA. Cell cycle events in neurons. Proliferation or death? *Am J Pathol.* 1999;155(2):327-9.
187. Kuo YC, Weng SC, Chou CJ, Chang TT, Tsai WJ. Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadae*. *Br J Pharmacol.* 2003;140(5):895-906.
188. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* 2019;40(7):584-97.
189. Hume S, Dianov GL, Ramadan K. A unified model for the G1/S cell cycle transition. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(22):12483-501.
190. Yadav S, Jahagirdar D, Shekhawat M, Sharma NK. Induction of S-phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HeLa Cells by Small RNAs Fraction of *Solanum tuberosum* L. *Microna.* 2019;8(3):180-88.
191. Barnaba N, LaRocque JR. Targeting cell cycle regulation via the G2-M checkpoint for synthetic lethality in melanoma. *Cell Cycle.* 2021;20(11):1041-51.
192. Suski JM, Braun M, Strmiska V, Sicinski P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell.* 2021;39(6):759-78.
193. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.
194. Yang K, Hitomi M, Stacey DW. Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Div.* 2006;18;1:32.
195. Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. Hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10699-704.

196. Henley SA, Dick FA. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div.* 2012;7(1):10.
197. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):994-1013.
198. Zhang M, Bi X, Liu S, Liu Y, Wang Q. The novel polyfluoroalkyl benzenesulfonate OBS exposure induces cell cycle arrest and senescence of rat pituitary cell GH3 via the p53/p21/RB pathway. *Toxicology*. 2023;490:153511.
199. Gemble S, Wardenaar R, Keuper K, Srivastava N, Nano M, Macé AS, Tjihuis AE, Bernhard SV, Spierings DCJ, Simon A, Goundiam O, Hochegger H, Piel M, Foijer F, Storchová Z, Basto R. Genetic instability from a single S phase after whole-genome duplication. *Nature*. 2022;604(7904):146-51.
200. Kousholt AN, Menzel T, Sørensen CS. Pathways for genome integrity in G2 phase of the cell cycle. *Biomolecules*. 2012;2(4):579-607.
201. Stark GR, Taylor WR. Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol Biol.* 2004;280:51-82.
202. da Silva Souto AC, Vieira Heimlich F, Lima de Oliveira L, Bergmann A, Dias FL, Spíndola Antunes H, de Melo AC, Thuler LCS, Cohen Goldemberg D. Epidemiology of tongue squamous cell carcinoma: A retrospective cohort study. *Oral Dis.* 2023;29(2):402-10.
203. Bodner L, Manor E, Friger MD, van der Waal I. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger--review and analysis of 186 reported cases. *Oral Oncol.* 2014;50(2):84-9.
204. Yosef E, Hilly O, Stern S, Bachar G, Shpitzer T, Mizrachi A. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: Distinct epidemiological profile disease. *Head Neck.* 2020;42(9):2316-20.
205. Paderno A, Morello R, Piazza C. Tongue carcinoma in young adults: a review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2018;38(3):175-180.
206. Gonzalez M, Riera March A. Tongue Cancer. [Updated 2023 May 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
207. Cancer Research Institute UK, Tongue cancer treatment. Available at: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/mouth-cancer/stages-types-grades/tongue-cancer/treatment>
208. Le X, Hanna EY. Optimal regimen of cisplatin in squamous cell carcinoma of head and neck yet to be determined. *Ann Transl Med.* 2018;6(11):229.
209. Gyanani V, Haley JC, Goswami R. Challenges of Current Anticancer Treatment Approaches with Focus on Liposomal Drug Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(9):835.
210. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:599-616.
211. Moustakas M. The Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine. *Materials (Basel)*. 2021;14(3):549.
212. Chen QY, DesMarais T, Costa M. Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019;59:537-54.

213. Riccardi C, Piccolo M. Metal-Based Complexes in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):7289.
214. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
215. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* 2019 Jul;88:102925.
216. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics.* 2022;12(5):2115-32.
217. Ramilo-Gomes F, Addis Y, Tekamo I, Cavaco I, Campos DL, Pavan FR, Gomes CSB, Brito V, Santos AO, Domingues F, Luís Â, Marques MM, Pessoa JC, Ferreira S, Silvestre S, Correia I. Antimicrobial and antitumor activity of S-methyl dithiocarbamate Schiff base zinc(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2021;216:111331.
218. Savic M, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Stankovic V, Rilak Simovic A, Ladic D, Arsenijevic N, Milovanovic M. Antitumor Activity of Ruthenium(II) Terpyridine Complexes towards Colon Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020;25(20):4699.
219. Gałczyńska K, Drulis-Kawa Z, Arabski M. Antitumor Activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) Complexes. *Molecules.* 2020;25(15):3492.
220. Dimitrijević Stojanović MN, Franich AA, Jurišević MM, Gajović NM, Arsenijević NN, Jovanović IP, Stojanović BS, Mitrović SL, Kljun J, Rajković S, Živković MD. Platinum(II) complexes with malonic acids: Synthesis, characterization, in vitro and in vivo antitumor activity and interactions with biomolecules. *J Inorg Biochem.* 2022;231:111773.
221. Mojaddami A, Abedanzadeh S, Bagherzadeh M, Foroutan G, Khodayar MJ, Panahimehr M, Fereidoonzhad M. ROS-Mediated Antitumor Activity, Apoptosis, and Molecular Docking Studies of Platinum(II) Coordination Complexes Bearing 2-(Diphenylphosphino)pyridine Ligands. *Chem Biodivers.* 2023;20(7):e202201177.
222. Sun Q, Li Y, Shi H, Wang Y, Zhang J, Zhang Q. Ruthenium Complexes as Promising Candidates against Lung Cancer. *Molecules.* 2021;26(15):4389.
223. Liu T, Pan C, Shi H, Huang T, Huang YL, Deng YY, Ni WX, Man WL. Cytotoxic cis-ruthenium(III) bis(amidine) complexes. *Dalton Trans.* 2023 Jun 27;52(25):8540-8548. doi: 10.1039/d3dt00328k. PMID: 37000490.
224. Molinaro C, Martoriati A, Pelinski L, Cailliau K. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):2863.
225. Siqueira JD, de Pellegrin SF, Dos Santos SS, Iglesias BA, Piquini PC, Arantes LP, Soares FA, Chaves OA, Neves A, Back DF. SOD activity of new copper II complexes with ligands derived from pyridoxal and toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *J Inorg Biochem.* 2020;204:110950.
226. Rigobello MP, Messori L, Marcon G, Agostina Cinellu M, Bragadin M, Folda A, Scutari G, Bindoli A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J Inorg Biochem.* 2004;98(10):1634-41.
227. Karaca Ö, Scalcon V, Meier-Menches SM, Bonsignore R, Brouwer JM JL, Tonolo F, Folda A, Rigobello MP, Kühn FE, Casini A. Characterization of Hydrophilic Gold(I) N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complexes as Potent TrxR Inhibitors Using Biochemical and Mass Spectrometric Approaches. *Inorg Chem.* 2017;56(22):14237-14250.

228. Pellei M, Santini C, Bagnarelli L, Caviglia M, Sgarbossa P, De Franco M, Zancato M, Marzano C, Gandin V. Novel Silver Complexes Based on Phosphanes and Ester Derivatives of Bis(pyrazol-1-yl)acetate Ligands Targeting TrxR: New Promising Chemotherapeutic Tools Relevant to SCLC Management. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):4091.
229. Şahin-Bölükbaşı S, Cantürk-Kılıçkaya P, Kılıçkaya O. Silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes challenge cancer; evaluation of their anticancer properties and in silico studies. *Drug Dev Res.* 2021;82(7):907-26.
230. Czarnomysy R, Radomska D, Szewczyk OK, Roszczenko P, Bielawski K. Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8271.
231. Sarto LE, DE Gois EP, DE Andrade GG, DE Almeida MS, Freitas JTJ, DE Souza Reis Júnior A, Franco LP, Torres C, DE Almeida ET, Gouvêa CMCP. Anticancer Potential of Palladium(II) Complexes With Schiff Bases Derived from 4-Aminoacetophenone Against Melanoma In Vitro. *Anticancer Res.* 2019;39(12):6693-99.
232. Schoeberl A, Gutmann M, Theiner S, Corte-Rodríguez M, Braun G, Vician P, Berger W, Koellensperger G. The copper transporter CTR1 and cisplatin accumulation at the single-cell level by LA-ICP-TOFMS. *Front Mol Biosci.* 2022;9:1055356.
233. Nakamura H, Takada K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* 2021;112(10):3945-52.
234. Mantri Y, Lippard SJ, Baik MH. Bifunctional binding of cisplatin to DNA: why does cisplatin form 1,2-intrastrand cross-links with ag but not with GA? *J Am Chem Soc.* 2007 Apr 25;129(16):5023-30.
235. Rebillard A, Jouan-Lanhouet S, Jouan E, Legembre P, Pizon M, Sergent O, Gilot D, Tekpli X, Lagadic-Gossmann D, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin-induced apoptosis involves a Fas-ROCK-ezrin-dependent actin remodelling in human colon cancer cells. *Eur J Cancer.* 2010;46(8):1445-55.
236. Wang P, Cui J, Wen J, Guo Y, Zhang L, Chen X. Cisplatin induces HepG2 cell cycle arrest through targeting specific long noncoding RNAs and the p53 signaling pathway. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4605-12.
237. Zhu S, Shanbhag V, Wang Y, Lee J, Petris M. A Role for The ATP7A Copper Transporter in Tumorigenesis and Cisplatin Resistance. *J Cancer.* 2017;8(11):1952-58.
238. Jiang T, Jiang F, Zhuo Z, Liu H, Hu B, Li M, Li L, Huang Z, Zhou Z, Zhu Z. Comparative study on a kilowatt-MPT-MS-based method with two ion polarity modes for the inert palladium metal. *Analyst.* 2021;146(5):1760-71.
239. Simić D, Zarić M, Nikolić I, Živković-Zarić R, Čanović P, Kočović A, Radojević I, Raković I, Jovičić Milić S, Petrović Đ, Stojković D, Vuković N, Kačaniová M, Vukić M, Jevtić V. Newly synthesized palladium(II) complexes with aminothiazole derivatives: in vitro study of antimicrobial activity and antitumor activity on the human prostate cancer cell line. *Dalton Trans.* 2022;51(3):1191-205.
240. Juribašić M, Molčanov K, Kojić-Prodić B, Bellotto L, Kralj M, Zani F, Tušek-Božić L. Palladium(II) complexes of quinolinylaminophosphonates: synthesis, structural characterization, antitumor and antimicrobial activity. *J Inorg Biochem.* 2011;105(6):867-79.

241. Pruchnik H, Lis T, Latocha M, Zielińska A, Pruchnik FP. Palladium(II) complexes with tris(2-carboxyethyl)phosphine, structure, reactions and cytostatic activity. *J Inorg Biochem.* 2016;156:14-21.
242. Li Y, Gu Z, Zhang C, Li S, Zhang L, Zhou G, Wang S, Zhang J. Synthesis, characterization and ROS-mediated antitumor effects of palladium(II) complexes of curcuminoids. *Eur J Med Chem.* 2018;144:662-71.
243. Joksimović N, Janković N, Petronijević J, Baskić D, Popović S, Todorović D, Zarić M, Klisurić O, Vraneš M, Tot A, Bugarčić Z. Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with cisplatin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study. *Med Chem.* 2019: 30686264.
244. Zhang B, Luo H, Xu Q, Lin L, Zhang B. Antitumor activity of a Trans-thiosemicarbazone schiff base palladium (II) complex on human gastric adenocarcinoma cells. *Oncotarget.* 2017;8(8):13620-131.
245. Espino J, Fernández-Delgado E, Estirado S, de la Cruz-Martinez F, Villa-Carballar S, Viñuelas-Zahinos E, Luna-Giles F, Pariente JA. Synthesis and structure of a new thiazoline-based palladium(II) complex that promotes cytotoxicity and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):16745.
246. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 23;19(4):970.
247. Asif PJ, Longobardi C, Hahne M, Medema JP. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis. *Cancers (Basel).* 2021;13(18):4720.
248. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol.* 2021;81(4):1133-43.
249. Bononi G, Iacopini D, Cicio G, Di Pietro S, Granchi C, Di Bussolo V, Minutolo F. Glycoconjugated Metal Complexes as Cancer Diagnostic and Therapeutic Agents. *ChemMedChem.* 2021;16(1):30-64.
250. Jayakumar T, Sheu J-R, Hsia C-W, Bhavan PS, Chang C-C. Anti-Inflammatory Mechanisms of Novel Synthetic Ruthenium Compounds. *Applied Sciences.* 2021; 11(21):10092.
251. Hosseini-Kharat M, Rahimi R, Alizadeh AM, Zargarian D, Khalighfard S, Mangin LP, Mahigir N, Ayati SH, Momtazi-Borojeni AA. Cytotoxicity, anti-tumor effects and structure-activity relationships of nickel and palladium S,C,S pincer complexes against double and triple-positive and triple-negative breast cancer (TNBC) cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021;43:128107.
252. Svoboda, Jan, et al. "Trans-palladium complexes with 1-adamantanamine and various halide ions: Synthesis, characterization, DNA and protein binding and in vitro cytotoxicity." *Polyhedron* 209. 2021: 115458.
253. Omondi RO, Bellam R, Ojwach SO, Jaganyi D, Fatokun AA. Palladium(II) complexes of tridentate bis(benzazole) ligands: Structural, substitution kinetics, DNA interactions and cytotoxicity studies. *J Inorg Biochem.* 2020;210:111156.
254. Valentini A, Conforti F, Crispini A, De Martino A, Condello R, Stellitano C, Rotilio G, Ghedini M, Federici G, Bernardini S, Pucci D. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells. *J Med Chem.* 2009;52(2):484-91.

255. Bjelogrić SK, Todorović TR, Kojić M, Senćanski M, Nikolić M, Višnjevac A, Araškov J, Miljković M, Muller CD, Filipović NR. Pd(II) complexes with N-heteroaromatic hydrazone ligands: Anticancer activity, in silico and experimental target identification. *J Inorg Biochem.* 2019;199:110758.

Биографија:

Миона Глишић, рођена је 27.06.1993. године у Крагујевцу. Завршила је основну школу Радоје Домановић као носилац Вукове дипломе и Прву крагујевачку гимназију, природно-математички смер, као носилац Вукове дипломе. ИАС стоматологије уписала је 2012. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, а 2017. године је дипломирала са просечном оценом 8.8. Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 2017. године, изборно подручје Експериментална и примењена физиологија са спортском медицином. Специјалистичке студије уписује 2018. године, а завршава их 2023. године са одличном оценом и стиче звање специјалисте Болести зуба и ендодонције. Члан је Стоматолошке коморе Србије и Удружења ендодонтиста Србије. Објавила је више научних и стручних публикација у домаћим и страним часописима.

Библиографија:

1. **Glišić M**, Čanović PP, Zarić MM, Živković Zarić RS, Franich A, Rajković S, Živković M. The cytotoxicity of palladium (II) complexes containing 1, 2-or 1, 4-diazine bridging ligands on squamous cell carcinoma cells in vitro: Insights in the mechanisms of action. *Applied Organometallic Chemistry*. 2024:e7449.
2. **Glišić M**, Milojević A, Milinković M, Ranković M. The Effects of Different Drugs with Anti-Inflammatory Potential in Prevention of Pulp Damage During the Teeth Bleaching. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR)* 2023; doi: 10.2478/sjecr-2021-0015.
3. Popović M, Živanović S, Vučićević T, **Grujović M**, Papić M. Cone-beam computed tomography study of tooth root and canal morphology of permanent molars in a Serbian population. *Vojnosanitetski pregled*. 2020;77(5):470-8.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**“ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НОВОСИНТЕТИСНИХ
КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) НА ЋЕЛИЈЕ СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ
КАРЦИНОМА УСНЕ ДУПЉЕ *IN VITRO*“**

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, 15.04.2024. године,



потпис аутора

Образац 2

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

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

**“ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НОВОСИНТЕТИСНИХ
КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) НА ЂЕЛИЈЕ СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ
КАРЦИНОМА УСНЕ ДУПЉЕ *IN VITRO*“**

истоветне.

У Крагујевцу, 15.04.2024. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Миона Глишић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

“ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) НА ЋЕЛИЈЕ СКВАМОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА УСНЕ ДУПЉЕ *IN VITRO*“

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 15.04.2024. године,



потпис аутора

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