

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

НАЗИВ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ ЗА ПРИРОДНЕ И ТЕХНИЧКЕ НАУКЕ

|           |              |
|-----------|--------------|
| Преглед   | 12. 02. 2025 |
| Орг. јед. |              |
| 05        | 770          |

ОЦЕНА МЕНТОРА О ИЗВЕШТАЈУ О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ  
ДИСЕРТАЦИЈЕ ОДНОСНО ДОКТОРСКОГ УМЕТНИЧКОГ ПРОЈЕКТА

|                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| НАЗИВ<br>ДИСЕРТАЦИЈЕ                                                                                                            | Нови хетеронуклеарни Pt(II)-L-Zn(II) комплекси: испитивање<br>антитуморске активности на ћелијама колоректалног<br>крацинома, <i>in vitro</i> |
| Кандидат                                                                                                                        | Самир Вучељ                                                                                                                                   |
| Ментор:                                                                                                                         | проф. др Тања Солдатовић                                                                                                                      |
| Коментор                                                                                                                        | проф. др Иван Јовановић                                                                                                                       |
| Датум пријема потпуног извештаја о<br>провери оригиналности докторске<br>дисертације, односно докторског<br>уметничког пројекта | 11.02.2025.                                                                                                                                   |

Изјављујемо да је докторска дисертација Самира Вучеља оригинално научно дело која је резултат научног рада докторанда. Кандидат је испоштовао академска правила цитирања, навођења извора и сл., што потврђује библиографија докторске дисертације, која се састоји од 260 библиографских јединица. Програм за проверу плагијаризма на Универзитету у Крагујевцу је пронашао је укупно подударање од 24% (6% - phaidrabg.bg.ac.rs; 6% - fedorakg.kg.ac.rs; 6% - nardus.mpn.gov.rs 1% - ouci.dntb.gov.ua; 1%-eteze.bg.ac.rs; 1% - fedorabg.bg.ac.rs; 1% - fedorani.ni.ac.rs; 1% - www.medf.kg.ac.rs). Ова подударања су последица навођења цитата, општих појмова, цитирања референци, података, формула, као и подударност са истраживањима који су имали исту или сличну методологију. У највећем обиму је пронађено подударање са претходно публикованим резултатима докторандових истраживања, који су проистекли из његове докторске дисертације (6% - phaidrabg.bg.ac.rs; 6% - fedorakg.kg.ac.rs).

На основу свега изнетог, а у складу са Правилника о поступку провере на плагијаризам на Универзитету у Крагујевцу, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити (позитивна оцена).

Датум  
11.02.2025.

ПОТПИС МЕНТОРА

  
Проф. др Тања Солдатовић

ПОТПИС КОМЕНТОРА

  
Проф. др Иван Јовановић

Нови хетеронуклеарни Pt(II)-L-Zn(II)  
комплекси: испитивање  
антитуморске активности на  
ћелијама колоректалног карцинома,  
in vitro

*Бу Самир Вучељ*



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Самир А. Вучељ

**Нови хетеронуклеарни Pt(II)-L-Zn(II)  
комплекси: испитивање  
антитуморске активности на  
ћелијама колоректалног карцинома,  
*in vitro***

**3**  
Докторска дисертација

Крагујевац, 2024.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FAKULTY OF MEDICAL SCIENCES

Samir A. Vučelj

**New heteronuclear Pt(II)-L-Zn(II)  
complexes: testing of antitumor activity on  
colorectal cancer cells, *in vitro***

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2024.



## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

| Аутор                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Име и презиме: Самир Вучељ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Датум и место рођења: 18.12.1982. Лепосавић                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Садашње запослење: Интерно одељење, одсек за гастроентерохепатологију,<br>Општа болница Нови Пазар                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Докторска дисертација</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Наслов: Нови хетеронуклеарни комплекси Pt(II)-L-Zn(II) комплекси: испитивање<br>антитуморске активност на ћелијама колоректалног карцинома, <i>in vitro</i>                                                                                                                                                                                                                     |
| Број страница: 94                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Број слика: 24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Број табела: 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Број схема: 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Број графикона: 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Број библиографских података: 260                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у<br>Крагујевцу                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Научна област (УДК): Медицина                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Ментори:<br><br><b>Проф. др Тања Солдатовић</b> , ванредни професор Департмана за природно-<br>математичке науке Државног универзитета у Новом Пазару за ужу научну област<br>Неорганска хемија<br><b>Проф. др Иван Јовановић</b> , редовни професор Факултета медицинских наука<br>Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и<br>имунологија и Онкологија |
| Датум пријаве теме: 19.03.2024. године                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске<br>дисертације: IV-03-667/33 од 25.09.2022. године                                                                                                                                                                                                                                                            |

## DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

| Autor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Name and surname: Samir Vučelj                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Date and place of birth: 18.12.1982. Leposavić                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Current employment: Internal Department, Department of gastroenterohepatology, General hospital Novi Pazar                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Doctoral Dissertation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Title: New heteronuclear Pt(II)-L-Zn(II) complexes: testing of antitumor activity on colorectal cancer cells, <i>in vitro</i>                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| No. of pages: 94                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| No. of images: 24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| No. of table: 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| No. of scheme: 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| No. of chart: 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| No. of bibliographic data: 260                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Scientific area (UDC): Medicine                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Mentors:<br><br><b>Prof. Dr. Tanja Soldatović</b> , Associate Professor at the Department of Natural-Mathematical Sciences, State University of Novi Pazar for the narrow scientific field of Inorganic Chemistry<br><b>Prof. Dr. Ivan Jovanovic</b> , Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and immunology and Oncology |
| Topic Application Date: 19.03.2024.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-667/33 from 25.09. 2024.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

„Захвално срце је не само највећа врлина,  
него и темељ свих врлина!“

-Цицерон

Захвалност дугујем менторима проф. др Тањи Солдатовић и проф. др Ивану Јовановићу на стручној помоћи, саветима као и на стрпљењу и разумевању које су за мене имали.

И посебно се захваљујем мојој Ајни и Лејли, које су у мој живот и рад унеле смисао.

## САЖЕТАК

**Увод:** Синтетисана је и окарактерисана серија моно- и хетеронуклеарних комплекса платине(II) и цинка(II) са инертним лигандом 4,4',4-три-*tert*-бутил-2,2':6'2"-терпиридином.

**Материјал и методе:** ДНК и протеин-везујућа својства  $[ZnCl_2(terpy^{tBu})]$  (**C1**),  $[{cis-PtCl(NH_3)_2(\mu\text{-пиразин})ZnCl(terpy^{tBu})}](ClO_4)_2$  (**C2**),  $[{trans-PtCl(NH_3)_2(\mu\text{-пиразине})ZnCl(terpy^{tBu})}](ClO_4)_2$  (**C3**),  $[{cis-PtCl(NH_3)_2(\mu\text{-}4,4'\text{-бипиридил})ZnCl(terpy^{tBu})}](ClO_4)_2$  (**C4**),  $[{trans-PtCl(NH_3)_2(\mu\text{-}4,4'\text{-бипиридил})ZnCl(terpy^{tBu})}](ClO_4)_2$  (**C5**) комплекса (где је  $terpy^{tBu}$ =4,4',4-три-*tert*-бутил-2,2':6'2"-терпиридин) испитана су путем електронске апсорпције, флуоресценције и методом молекулског докинга. Антиканцерогена активност комплекса платине(II) и цинка(II) је испитивана на ћелијским линијама мишијег карцинома колоректума, као и на здравој линији мезенхималних матичних ћелија миша, коришћењем МТТ теста.

**Резултати:** Комплекси који садрже трансплатину показали су ниже вредности константи  $K_b$  и  $K_{sv}$  у поређењу са цисплатинским аналозима. Најнижу вредност  $K_{sv}$  имао је комплекс **C1**, док је **C4** показао највишу. Молекулске докинг студије су показале да је веза комплекса **C1** са ДНК последица ван дер Валсових сила, док су везе **C2-C5** конвенционалне водоничне везе и ван дер Валсових силе. Тестирани комплекси показали су варијабилну цитотоксичност према мишјем колоректалном карциному (CT26), људском колоректалном карциному (HCT116 и CW480) и нормалним мишјим мезенхималним матичним ћелијама (mMSC). Посебно, мононуклеарни комплекс **C1** показао је изражену селективност према канцерогеним ћелијама у односу на неканцерогене mMSC. Комплекс **C1** значајно је изазвао апоптозу у CT26 ћелијама, ефикасно зауставио ћелијски циклус у фази G0/G1, и селективно смањio изражај циклина D.

**Закључак:** Добијени резултати указују да новосинтетисани моно- и хетеронуклеарни комплекса платине(II) и цинка(II) показују антитуморску активност ка туморске ћелије колоректалног карцинома и имају потенцијал да постану могући кандидати у антиканцерској терапији.

**Кључне речи:** хетеронуклеарни комплекс; 4,4',4-три-*tert*-бутил-2,2':6'2"-терпиридин; корелација структура-реактивност; цитотоксична активност; колоректални карцином

## ABSTRACT

4

**Introduction:** A series of mono- and heteronuclear platinum(II) and zinc(II) complexes with 4,4,4-tri-*tert*-butyl-2,2':6',2''-terpyridine ligand were synthesized, and characterized.

**Material and methods:** The DNA and protein binding properties of  $[\text{ZnCl}_2(\text{terpy}^{\text{tBu}})]$  (**C1**),  $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-pyrazine})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C2**),  $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-pyrazine})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C3**),  $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'-bipyridyl})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C4**) and  $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'-bipyridyl})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C5**) ( $\text{terpy}^{\text{tBu}}$  = 4,4',4''-tri-*tert*-butyl-2,2':6',2''-terpyridine), were investigated by electronic absorption, fluorescence spectroscopic, and molecular docking methods. The *in vitro* anticancer activity of the complexes was investigated in murine cancer cell lines and a normal murine cell line by MTT assay.

1

**Results:** Complexes featuring transplatin exhibited a lower  $K_b$  and  $K_{sv}$  constant values compared to cisplatin analogues. The lowest  $K_{sv}$  value belonged to complex **C1**, while **C4** exhibited the highest. Molecular docking studies reveal that the binding of complex **C1** to DNA is due to van der Waals forces while, that of **C2-C5** is due to conventional hydrogen bonds and van der Waals forces. The tested complexes exhibited variable cytotoxicity toward mouse colorectal carcinoma (CT26), human colorectal carcinoma (HCT116 and SW480), and non-cancerous mouse mesenchymal stem cells (mMSC). Particularly, mononuclear **C1** complex showed pronounced selectivity towards cancer cells over non-cancerous mMSC. The **C1** complex notably induced apoptosis in CT26 cells and effectively arrested the cell cycle in the G0/G1 phase and selectively down-regulated Cyclin D.

1

**Conclusion:** Obtained results indicate that these novel mono- and heteronuclear platinum(II) and zinc(II) complexes revealed activity in colorectal cancer and have the potential to become possible candidates for cancer treatment.

**Keywords:** heteronuclear complexes; 4,4',4''-tri-*tert*-butyl-2,2':6',2''-terpyridine; structure–reactivity correlation; cytotoxic activity; colorectal cancers

## САДРЖАЈ

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Увод.....</b>                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1 Историјат.....                                                                  | 1         |
| 1.2 Општи аспекти колоректалног карцинома.....                                      | 2         |
| 1.3. Епидемиологија колоректалног карцинома.....                                    | 4         |
| 1.3.1 Епидемиологија колоректалног карцинома у Р. Србији.....                       | 8         |
| 1.4 Фактори ризика за настанак колоректалног карцином.....                          | 8         |
| 1.5. Патогенеза колоректалног карцинома.....                                        | 9         |
| 1.5.1 Молекуларни путеви колоректалне карциногенезе.....                            | 11        |
| 1.5.1.1 Традиционални пут.....                                                      | 12        |
| 1.5.1.2 Мутаторски пут.....                                                         | 13        |
| 1.5.1.3 Метилаторски пут.....                                                       | 14        |
| 1.5.2 Процес метастазирања.....                                                     | 15        |
| 1.6. Клиничка презентација колоректалног карцинома.....                             | 15        |
| 1.7 Класификација колоректалног карцинома.....                                      | 17        |
| 1.8 Патолошки стадијум колоректалног карцинома.....                                 | 18        |
| 1.9. Лечење колоректалног карцинома.....                                            | 19        |
| 1.9.1 Радиотерапија.....                                                            | 19        |
| 1.9.2 Хемиотерапија и генетско тестирање.....                                       | 19        |
| 1.9.2.1 Антитуморска активност комплекса.....                                       | 21        |
| 1.9.3 Хемиорадиотерапија.....                                                       | 28        |
| 1.9.4 Циљана терапија: биолошка и имунотерапија.....                                | 28        |
| <b>2. Циљеви и хипотезе истраживања.....</b>                                        | <b>30</b> |
| 2.1 Циљ истраживања.....                                                            | 30        |
| 2.2 Радне хипотезе.....                                                             | 30        |
| <b>3. Материјал и методе.....</b>                                                   | <b>28</b> |
| 3.1 Хемикалије.....                                                                 | 31        |
| 3.2 Инструменти.....                                                                | 31        |
| 3.3 Синтеза комплекса.....                                                          | 31        |
| 3.3.1 Синтеза мононуклеарног комплексног једињења $[ZnCl_2(terpy^{tBu})]$ (C1)..... | 31        |

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.2 Припрема <i>cis</i> - или <i>trans</i> -[PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)](ClO <sub>4</sub> )..... | 32        |
| 3.3.3. Припрема [ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub> .....                                          | 32        |
| 3.3.4 Синтеза хетеронуклеарних платина(II)/цинк(II) комплексних једињења (C2-C5).....                                          | 32        |
| 3.4 Карактеризација мононуклеарног и хетеронуклеарних комплексних једињења.....                                                | 32        |
| 3.5 Испитивање интеракције синтетисаних комплексних једињења са ДНК.....                                                       | 32        |
| 3.5.1 Апсорпциона спектроскопска мерења.....                                                                                   | 32        |
| 3.5.2 Флуоресцент.на мерења.....                                                                                               | 33        |
| 3.5.3 Испитивање интеракције комплекса са хуманим серум албумином.....                                                         | 33        |
| 3.6. Компјутерске методе.....                                                                                                  | 34        |
| 3.6.1 DFT (Density Functional Theory) калкулације.....                                                                         | 34        |
| 3.6.2 Симулације молекулског докинга.....                                                                                      | 34        |
| 3.7. Методологија <i>in vitro</i> експримента.....                                                                             | 35        |
| 3.7.1 Ћелијске линије и култивација ћелија.....                                                                                | 34        |
| 3.7.2 МТТ тест: процена вијабилности ћелија рака након третмана хетеронуклеарним комплексима.....                              | 36        |
| 3.7.3 Анализа апоптотске смрти.....                                                                                            | 36        |
| 3.7.4 Анализа потенцијалног про-апоптотског ефекта испитиваног комплекса.....                                                  | 33        |
| 3.7.5 Анализа експресије Ki67.....                                                                                             | 37        |
| 3.8. Статистичка обрада података.....                                                                                          | 37        |
| <b>4. Резултати.....</b>                                                                                                       | <b>38</b> |
| 4.1 Синтеза и карактеризација.....                                                                                             | 38        |
| 4.1.1 Резултати карактеризације.....                                                                                           | 40        |
| 4.1.1.1 Спектри C1–C5 комплексних једињења.....                                                                                | 41        |
| 4.2 Испитивање интеракције C1-C5 комплекса са ДНК.....                                                                         | 50        |
| 4.2.1 Електронска апсорпциона метода.....                                                                                      | 50        |
| 4.2.2 Флуоресцентна мерења.....                                                                                                | 51        |
| 4.3 Испитивање интеракције C1-C5 комплекса са хуманим серум албумином.....                                                     | 51        |
| 4.4 Резултати симулације молекулског докинга.....                                                                              | 52        |
| 4.4.1 Интеракција са ДНК.....                                                                                                  | 52        |
| 4.4.2 Интеракција са ХСА.....                                                                                                  | 53        |
| 4.5 Резултати процене антитуморске активности.....                                                                             | 53        |

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.1 МТТ тест: Процена цитотоксичности у <i>in vitro</i> условима хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II).....  | 53        |
| 4.5.2 Процена апоптотске смрти ћелија изазване C1 комплексом.....                                                         | 56        |
| 4.5.3 Ефекти комплекса C1 на ћелијски циклус и пролиферацију у ћелијама карцинома СТ26.....                               | 58        |
| <b>5. Дискусија.....</b>                                                                                                  | <b>63</b> |
| 5.1. Синтеза и карактеризација.....                                                                                       | 64        |
| 5.2 Испитивање интеракције C1-C5 комплекса са ДНК.....                                                                    | 65        |
| 5.3 Испитивање интеракције C1-C5 комплекса са хуманим серум албумином.....                                                | 68        |
| 5.4 Анализа резултата добијених симулацијом молекулског докинга.....                                                      | 70        |
| 5.4.1 Интеракција са ДНК и ХСА .....                                                                                      | 70        |
| 5.5 Антитуморске активности хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II)...                                           | 72        |
| 5.5.1 Процена цитотоксичности у <i>in vitro</i> условима хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II) МТТ тестом..... | 72        |
| 5.5.2 Процена апоптотске смрти ћелија изазване C1 комплексом.....                                                         | 73        |
| 5.5.3 Ефекти комплекса C1 на регулаторе ћелијског циклус и пролиферацију у ћелијама карцинома СТ26.....                   | 75        |
| <b>6. Закључак.....</b>                                                                                                   | <b>77</b> |
| <b>7. Литература.....</b>                                                                                                 | <b>78</b> |



## 1. УВОД

Карцином карактерише неуспех у регулацији раста ткива, услед неконтролисаног раста, малигне ћелије утичу на здраве ћелије уништавајући их и доводе до раста тумора. Путем лимфе или крви, могу се проширити или метастазирати на друге делове тела, и ова малигна својства га разликују од бенигних тумора (1). За трансформацију здравих ћелија у малигне, неопходне су промене у наследним факторима који управљају њиховим развојем, нарушавајући нормалан процес диференцијације ћелије (2,3).

Проценом трендова на глобалном нивоу се очекује да ће у XXI веку малигне болести бити основни узрок морталитета у већини земаља света и убедљиво најважнија препрека за продужење просечног животног века, упркос томе што актуелно неинфективна патологија представља водећи узрок смртности (4,5). Од 172 земље света карцином је први или други узрок морталитета пре осме деценије живота у 91 земљи на основу података Светске здравствене организације (СЗО) за 2015. годину, а налази се на трећем или четвртом месту у остале 22 земље (5).

Све је извесније да већа заступљеност и смртни исход од малигних болести највише потичу од неизбежног старења популације, али и од сталног раста њеног броја на глобалном нивоу. Међутим узрок томе није јединствен о томе говори у прилог раширеност и преваленца главних фактора обољевања који су у вези са социјалним приликама и економским стандардом (6,7).

Са тим у вези, пораст морталитета од малигнитета донекле је повезан са релативним падом броја умрлих од исхемијске болести срца и мозга у поређењу са карциномима са обзиром на пораст укупног броја становника и старењем популације у већини земаља (4).

Малигне болести са већом инциденцом у земљама са високим стандардом које су повезане са западњачким стилем живота, бележе свој пораст у земљама у развоју у односу на малигнитете који су у вези са инфекцијом и лошим животним стандардом (7-9).

Различит степен економског напретка друштва а у корелацији са животним навикама и уз деловање локалних узрока ризика на становништво доводи до тога да постоје различите врсте карцинома међу регионима означавајући специфичну територијалну распрострањеност у одређеним подручјима (5).

### 1.1 Историјат

Термин "колон" први је користио Аристотел, док се у Хипократовим списима, који датирају из 400. године п.н.е., налазе значајнији подаци о обољењима и лечењу болести дебелог црева. Ректални пролапс је забележен још 1500. године п.н.е. у Еберсовом папирусу, што се сматра првим познатим документованим случајем болести дебелог црева (10).

Године 1543, Андреас Везалијус је увео анатомске дисекције, чиме је поставио темеље за прва детаљна истраживања и опсервације везане за анатомију и физиологију дебелог црева и ректума. Прву цекостомију извео је Пилор (Pillore) 1776. године због карцинома

(11). Мекел је 1817. године објавио важна истраживања која су се бавила ембрионалним развојем дебелог црева, чиме је значајно допринео разумевању његове анатомије и развојних процеса (12).

Лисфранка (Lisfranc) се први повезује са хируршким лечењем малигнитета дебелог црева. Нелатон (Nélaton) је 1839. године први описао експозицију, фиксацију и инцизију дистениране вијуге црева проксимално од места опструкције (11). Године 1884, Ребард је први успешно обавио ресекцију дебелог црева са успостављањем анастомозе због малигнитета. Након тога, Хенри Хартман је 1923. године описао хируршки приступ лечењу опструктивног карцинома у дисталном делу колона (10-12). Ресекције колона су допринеле развоју новог система класификације карцинома дебелог црева, који је 1932. године увео Катберт Дјукс (11,12).

## 1.2 Општи аспекти колоректалног карцинома

Најприсутније болести дебелог црева чине синдром иритабилног црева, малигнитети, полипи и запаљенске болести црева (13).

Колоректални карцином је примарни злоћудни епителни тумор који обухвата регије дебелог црева (цекума, асцендентни, трансверзални, десцендентни и сигмоидални део колона) и ректума стога се уобичајено назива карциномом колоректума без обзира на то где је примарно смештен малигни тумор. Методе лечења и прогноза овог обољења у великој мери зависе од локализације карцином тј, да ли припада десностраном или левостраном колону и ректуму односно на проксималном или дисталном колону, што је последица развојних, микроскопских и структурних специфичности, као и етиопатогенетског развоја овог малигног тумора (14).

Колоректални карцином је један од најраспрострањенијих типова малигних лезија у људској популацији у свим развијеним земљама, са забрињавајућим трендом повећања учесталости који подједнако погађа оба пола. Процењује се да ће 6% особа током свог живота оболети од колоректалног карцинома, а половина њих ће умрети од те болести (15).

Генетске, епидемиолошке и експерименталне студије указују на то да је за настанак колоректалног карцинома одгово

рна сложена интеракција између наследне предиспозиције и спољашњих фактора. Осим екстерних чинилаца који делују на ћелију, она мора бити под утицајем и генетских патолошких механизма који ће изазвати неконтролисано умножавање. Чиниоци који су у вези с повећаним опасностима од настанка рака су полипи, малигнитети других локализација, позитивна породична анамнеза, различите запаљенске болести црева и дисфункција имуног система (16).

Већина колоректалних карцинома јавља се спорадично, услед генетских варијација у интеракцији с различитим спољашњим факторима ризика. Такође, значајну страну представља и наследни фактор (17). Код највећег броја болесника (преко 90%), карцином дебелог црева настаје из аденома, који је предуслов свих даљих догађаја у механизму развоја карцинома (18).

Важну улогу наслеђа у развоју малигнитета показује 5% свих случајева колоректалног карцинома који су херeditарни облици и повезани су са високо пенетрабилним

герминативни<sup>2</sup> генским мутацијама, од којих су најчешћи Lynch синдром или херeditарни неполипозни колоректални карцином (енгл. *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* - HNPCC), фамилијарна аденоматозна полипоза (енгл. *Familial Adenomatous Polyposis*, FAP), Peutz-Jeghers-ова хамартоматозна полипоза и остали (19).

Карцином колоректума је идеалан за рану детекцију и превенцију путем скрининга због релативно продуженог тока развоја, који започиње од преканцерозних лезија и постепено се развија до почетних стадијума малигнитета (20).

Претпоставља се смањење учесталости одстрањивањем предканцерозних лезија (20-22), процењено је да смањење морталитета износи 21-33% идентификовањем почетних стадијума карцинома колона и ректума (22).

Главне типове тумора колона укључују: 1) аденокарцином, 2) сквамозноћелијски (планоцелуларни) карцином, 3) карциноидне туморе, 4) саркоме, и 5) лимфоме. Аденокарциноми који настају из секреторних ћелија у структури црева представљају више од 95% карцинома колона и ректума.

Аденокарциноми се деле у две врсте на основу морфологије ћелија рака: муцинозни (98-99% аденокарцинома, ћелије се налазе у слузи) или прстен тумори (1-2% аденокарцинома, слуз је унутар ћелија рака). Аденокарциноми могу бити класификовани као добро диференцирани, умерено диференцирани или слабо диференцирани, у зависности од степена сличности туморских ћелија са нормалним ћелијама ткива. Аденокарциноми, слично као и здрава цревна слузница, могу да луче муцин. Ова продукција муцина може бити повећана и то на рачун екстрацелуларне продукције муцина као и на рачун интрацелуларне продукције, када наилазимо на ћелије у облику прстена, код којих велика вакуола муцина дислоцира језгро дајући им типичан микроскопски изглед. Муцинозни аденокарциноми, који по критеријуму садрже више од 50% муцина у свом волумену, обично су повезани с неповољним исходом, присутни су код приближно 10% пацијената с аденокарциномом колона и ректума. Ако су туморске ћелије слабије диферентоване, њихова жлездана структура је слабије изражена, а самим тим и малигни је потенцијал већи (16).

Док су знатно чешће заступљени у једњаку или аналном каналу, примарни планоцелуларни карциноми дебелог црева углавном погађају мушкарце који припадају седмој деценији живота и изузетно су ретки. Клиничари треба да буду свесни могућности примарног колоректалног планоцелуларног карцинома и треба искључити његово присуство на другим местима пре дефинитивне дијагнозе. Лечење се углавном заснива на хируршкој интервенцији, која се прилагођава специфичним карактеристикама и природи тумора (23).

Неуроендокрини тумори (карциноиди) су ретки, њихова инциденција је порасла током протеклих година, што је вероватно резултат повећане укључености у програме скрининга колоноскопијом. Гастроинтестинални тракт је најчешће место настанка, при чему колоректум чини 200 од свих 1000 гастроинтестиналних неуроендокриних тумора, док је ректум друга најчешћа локализација након танког црева. Заступљенији су код особа са урођеним ендокриним поремећајима, као што су мултипла ендокрина неоплазија типа 1, неурофиброматоза типа 1, туберозна склероза и вон Хипел-Линдау. Већина неуроендокриних тумора су без симптома и откривају се случајно током колоноскопије као мала жућкаста субмукозна лезија са неоштећеном слузокожом, често смештена у средњем делу ректума (између 4 и 8 cm од аноректалног споја). Када су симптоматични могу се манифестовати проливом, болом у стомаку, губитком тежине или гастроинтестиналним крварењем; тешком анемијом, док хепатомегалија или

опипљива маса у абдомену могу бити повезани са метастатском болешћу. Фактори који предвиђају ризик од метастаза су величина тумора, мишићна и лимфоваскуларна инфилтрација и хистопатолошка диференцијација.

Неуроендокрини тумори величине од 10 до 20 mm се могу лечити ендоскопски, трансаналном ресекцијом или опсежном хирургијом и имају лошију прогнозу због већег ризика од инвазије мишићног слоја и лимфоваскуларне инфилтрације. Карциноиди, чија величина не прелази 10 mm, обухватају око 80% свих откривених неуроендокриних карцинома. По правилу имају мали ризик од малигног развоја и могу се успешно уклонити коришћењем ендоскопских техника или локалном хируршком ексцизијом. Тумори већи од 20 mm представљају кандидате за свеобухватну ресекцију ректума уз дисекцију лимфних жлезда због значајног ризик од метастазирања (24).

Примарни саркоми колоректума представљају ретку и разнолику групу мезенхималних карцинома, који чине свега 0,1% од укупног броја малигнитета дебелог црева. Иако су једном сматрани сличнима, ови саркоми сада се препознају као различито стање од других чешћих мезенхималних неоплазми, као што је гастроинтестиналнестромални тумор.

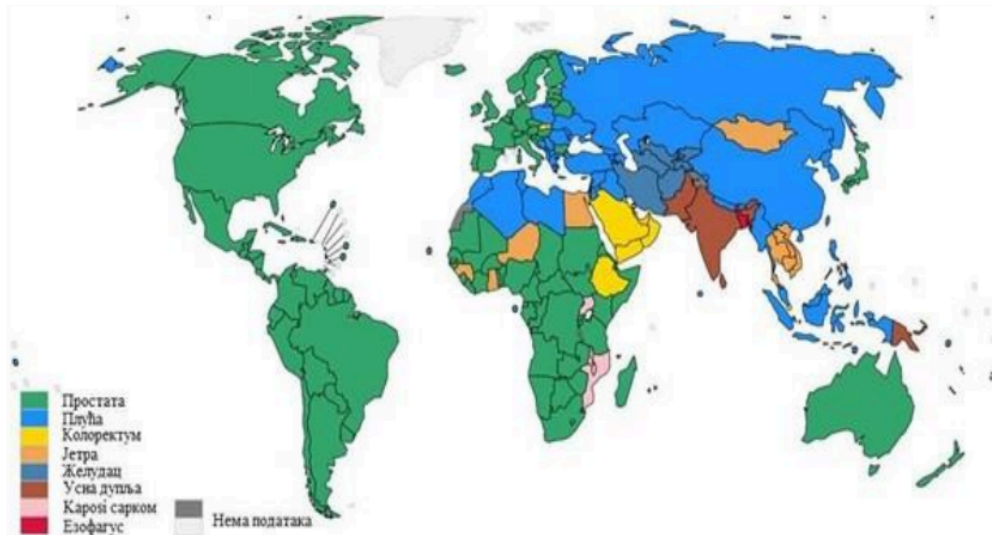
Саркоми колоректума су разнолика група тумора мезенхималног порекла, која обухвата више различитих подтипова, као што су лејомиосарком, хистиоцитом и десмопластични тумор малих округлих ћелија. Лејомиосаркоми, представљају најчешћи тип, обухватајући преко 90% свих примарних саркома у овој анатомској регији који се развијају из глатких мишићних ћелија дебелог црева. У односу на колоректални аденокарцином, примарни саркоми показују знатно агресивније понашање, јављају се код млађих пацијената и често су повезани са много неповољнијом прогнозом. Хирургија остаје основа лечења (25).

Примарни колоректални лимфоми се чешће јављају код мушкараца који припадају шестој деценији живота, налазе се на трећем месту по учесталости након аденокарцинома и карциноида и ретка су врста малигнитета дебелог црева. Због присуства значајних количина лимфоидног ткива у цекум и ректум, већа је учесталости патолошких процеса у тим деловима дебелог црева. Болесници се често јаве хирургу у стадијуму узнатредовале болести, са појавом илеуса, перфорације и стања интраабдоминалног апсцеса. Обично има облик полипоидне или улцеративне масе, а понекад формира израштај на мукози, слично полипоза. Лимфом је изузетно редак тумор, чини 14 од свих 1000 лимфома у људском телу, 100 до 200 од свих 1000 гастроинтестиналних лимфома, и само 2 до 6 на сваких 1000 малигних тумора дебелог црева (26).

Идеалан третман обухвата уклањање захваћеног дела колоне или ректума, заједно са регионалним лимфоваскуларним структурама, уз примену адјувантне терапије. Време преживљавања је кратко, те је неопходна правовремена дијагноза у раном стадијуму болести, када постоји велика могућност излечења (16). Иако 50% пацијената остаје до пет година након потенцијално куративне ресекције, укупно преживљавање је и даље незадовољавајуће, напредак је постигнут захваљујући растућем основном знању о особинама овог карцинома, као и појачаном раду на унапређењу превенције, евалуације и хируршких техника (22).

### 1.3 Епидемиологија колоректалног карцинома

У већини развијених региона света, укључујући и нашу земљу, малигнитети су по заступљености на другој позицији, одмах после кардиоваскуларних обољења (Слика1) (27). Здравствени системи широм света су у последње две деценије улагали напоре у развој посебних програма здравствене едукације и ране детекције тумора (28).



**Слика 1:** Приказ распрострањености појединих типова малигнитета у различитим регионима света (преузето са <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>).

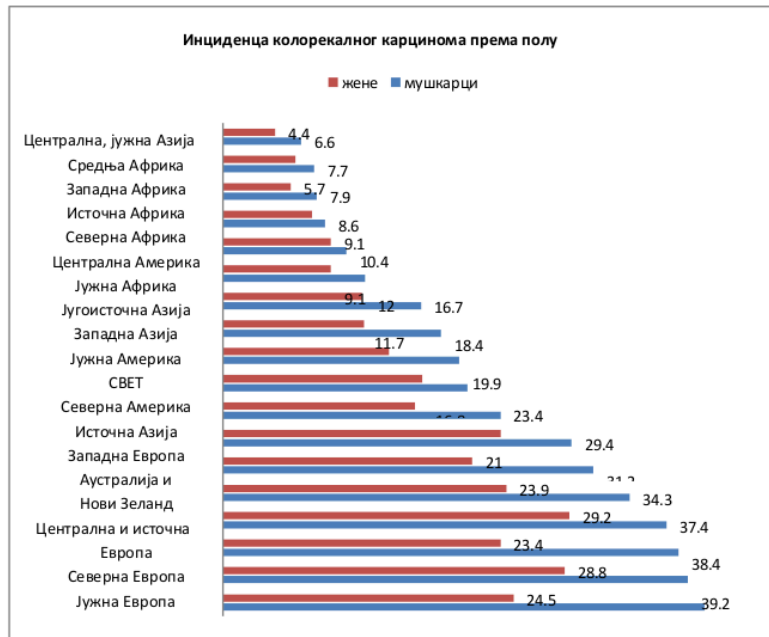
Колоректални карцином представља значајан здравствени и социјални изазов, будући да је један од најчешћих облика канцера и водећи узрок смртности од малигних обољења. Током 2020. године, у највећем делу света дијагностиковано је 1,9 милиона нових случајева, што чини 10% укупног броја свих карцинома, уз 935 хиљада смртних исхода тј. једна јединка премине на сваких тридесет секунди од малигнитет дебелог црева, што представља 94 од 1000 смртних исхода изазваних неопластичним процесом (29).

У поређењу са другим малигним обољењима, колоректални карцином је трећи најчешћи, одмах после карцинома плућа и дојке, док је по смртности на другом месту, након карцинома плућа. Код мушкараца, малигнитет дебелог црева је на трећем месту по учесталости, одмах након неоплазме плућа и простате. Одмах након карцинома дојке, по учесталости код жена на другом месту је овај малигнитет (30).

Учесталост колоректалног карцинома на светском нивоу износи 19,5% становништва, док је морталитет 9% становништва. Инциденца се значајно разликује између различитих региона света, са разликама и до седам пута. Највиша инциденца забележена је у развијеним деловима света, као што су земље Европе, Аустралије и Северне Америке, како је приказано на Графикону 2. Инциденца оболевања од колоректалног карцинома значајно се разликује између различитих етничких група. Код Афроамериканци је уочена виша учесталост овог обољења у односу на белу и жуту расу. Ризик оболевања од колоректалног карцинома варира и у зависности од примарне локализације малигнитета, те се повећава с годинама старости, јавља се око 50 године,

достигујући врхунац после 70. године. Проксимални колоректални карцином, односно карцином десне стране колона, чешћи је код пацијената старијих од 65 година, жена и афроамериканаца (31).

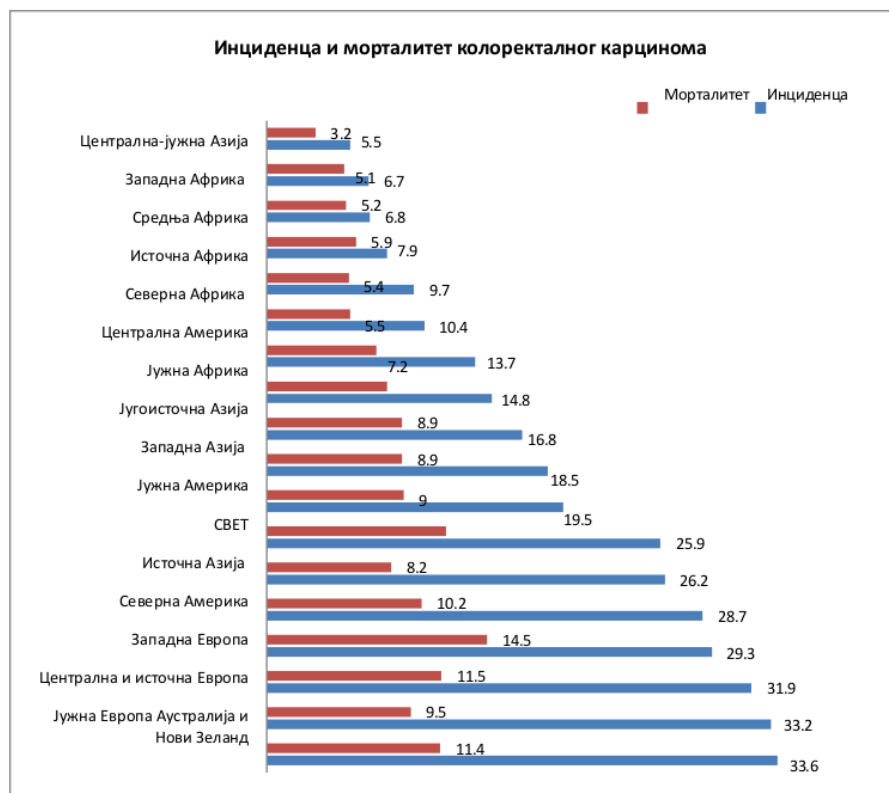
Како је приказано на Графикону 1, малигнитет је учесталији код мушког пола него код женског.



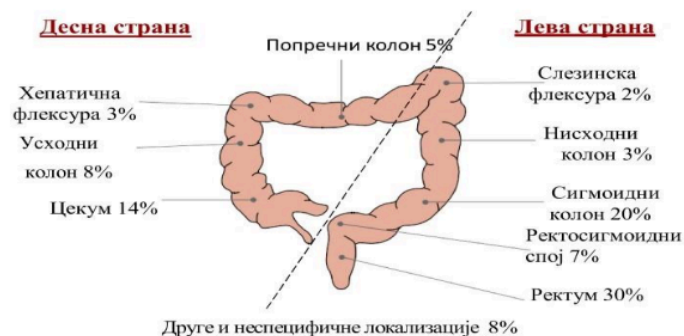
**Графикон 1.** За 2020. годину, у различитим деловима света приказана је инциденца колоректалног карцинома према полу (преузето и прерађено из Сунг Х, 2021).

3 Анатомска дистрибуција колоректалног карцинома варира у зависности од различитих студија, али се сматра да је најчешћа локализација у ректуму (око 50%), сигми (око 20%), затим у десном колону (слепо црево и усходни колон, око 15%), попречном (10%) и усходном колону (око 5%)(Слика 2). Већина истраживања се слаже да је преко две трећине ових тумора локализовано у ректуму и сигми (32). Инциденца колоректалног карцинома може се сматрати значајним показатељем економског стандарда и социјалних прилика једне земље, јер показује тренд пораста у складу са развојем те земље. Ово се објашњава променама у животном стилу које се јављају са развојем, укључујући више седетарни начин живота тј. недостатак физичке активности, исхрану у којој су заступљеније намирнице животињског порекла, што води ка повећаној конзумацији алкохола, доприноси гојазности и конзумирању дувана. Истраживања су показала да становништво које мигрира из неразвијених у развијене земље може имати повећану стопу обољевања од колоректалног карцинома. Ово је доведено у везу са променама у начину живота које се дешавају при преласку на нове услове живота у развијеним земљама (33).





**Графикон 2.** Стандардизована стопа учесталости и смртности на светском нивоу за 2020. годину (преузето и адаптирано из Сунг Х, 2021).



**Слика 2.** Распдела колоректалног карцинома према топографском положају малигнитета (преузето са Thrumurthy SG at all. Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. *BMJ*. 2016;354:3590).

### 1.3.1 Епидемиологија колоректалног карцинома у Р. Србији

Од укупног броја дијагностикованих од неког малигнитета у Републици Србији, непосредно иза малигнитета плућа и дојке на трећој позицији је неоплазма дебелог црева. Према подацима из Светске здравствене организације, Глобалне опсерваторије за рак (GLOBOCAN), у Србији је 2020. године било регистровано 5989 нових случајева колоректалног карцинома, што чини 12,2% од укупног броја случајева малигних обољења. Стандардизована стопа учесталости износи односно 0,0336% људи. За мушки пол, ова стопа износи 0,0464% становништва, док је за женски пол 0,0228% становништва. Смртност од овог малигнитета је 16,7 исхода на 100000 становника (34). Посматрајући регионе у Републици Србији, поједини делови који укључују Београд и Шумадију у односу Топлички округ, показују вишу учесталост карцинома колона и ректума. Ова појава може се тумачити различитим условима живота, исхране и нивоима стреса који су карактеристични за сваки од наведених региона (35).

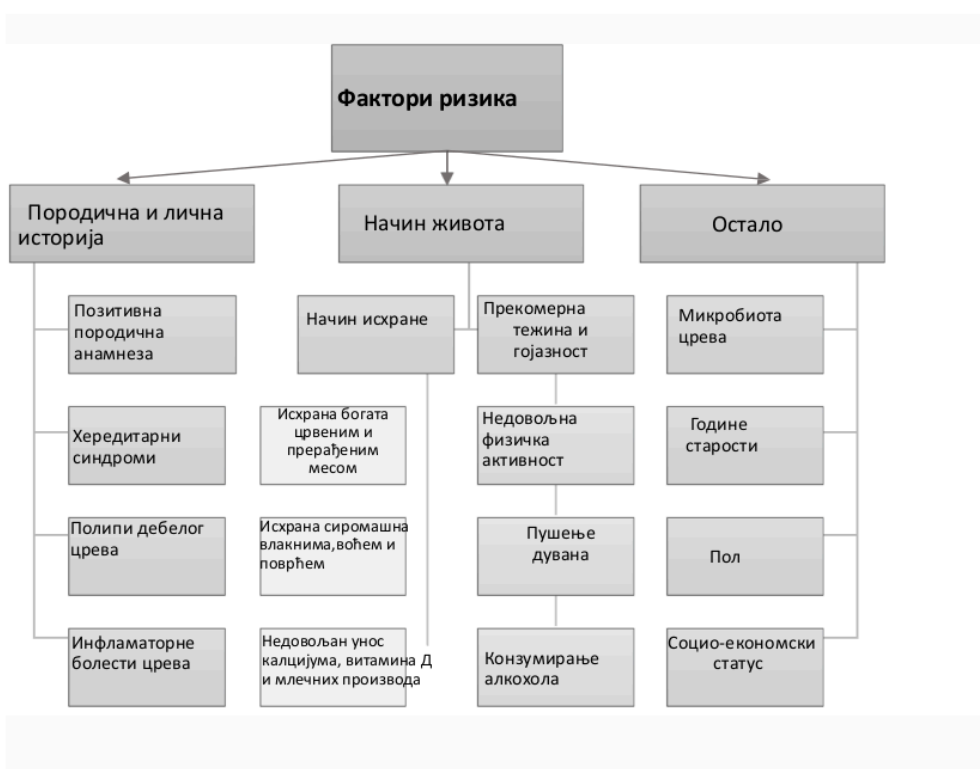
У последњих тридесет година широм света, забележен је пораст у броју новооболелих од колоректалног карцинома, али и дискретан пад у морталитету. Овај пад у морталитету даље се може приписати увођењу систематског скрининга коришћењем фекалних тестова на окултно крварење и колоноскопији. Овим методама се омогућава рано откривање болести у почетним стадијумима, који су често излечиви, као и уклањање преканцерозних лезија из дебелог црева пре њихове трансформације у карцином. У земљама где не постоје скрининг програми, инциденца и морталитет од колоректалног карцинома настављају да расту (36). Исто тако, уочава се стабилан тренд пораста инциденце у млађим добима, међу популацијом млађом од 50 година, за 1-4% годишње (37). Због ових промена, препоруке за скрининг колоректалног карцинома су се промениле, сугеришући да особе са просечним ризиком почну са скринингом већ од 45 година уместо претходних 50 година (38).

До 2040. године, предвиђа се да ће број новооболелих од колоректалног карцинома у свету достићи 3 милиона што представља пораст од 56% у односу на текуће бројке. Док се претпоставља да ће број смртних исхода од карцинома колоректума достићи милион и петсто хиљада до 2040. године, што представља значајан пораст од 69.4% у односу на постојеће бројке (39).

### 1.4 Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома

Интеракцијом фактора средине, наследних и епигенетских промена настаје сложена болест, колоректални карцином. Највише до сада испитивани фактори ризика за развој ове болести могу се поделити у две основне категорије: непроменљиве факторе ризика на које се не може утицати и променљиве факторе ризика који су потенцијално поправљиви тј. подлежу превенцији (Слика 3) (40-42).



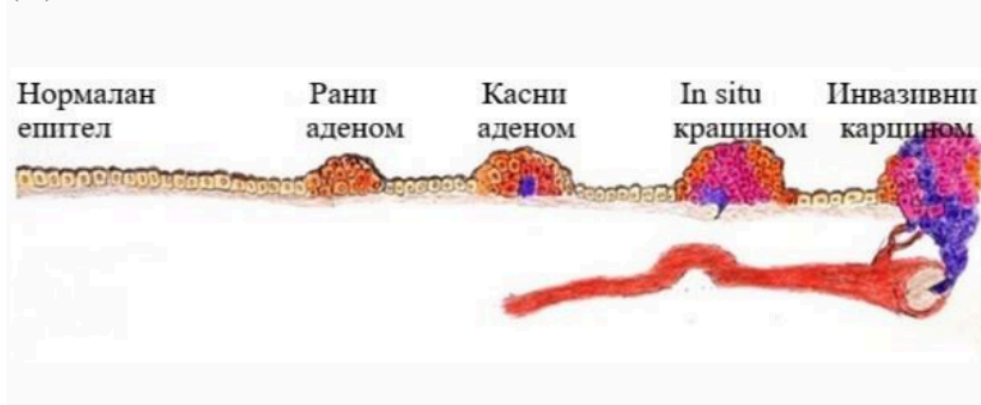


**Слика 3.** Кључни фактори ризика за развој колоректалног карцинома (преузето и модификовано од Sawicki et al. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. Cancers (Basel). 2021;13(9): 2025).

## 1.5 Патогенеза колоректалног карцинома

Следећи аденом-карцином секвенцу, колоректални тумор се развија као резултат малигне промене епителних ћелија дигестивног тракта. Развој карцинома дебелог црева је сложен и дуготрајан процес који се одвија у више фаза, епителне ћелије нормалне слузокоже колоне пролазе кроз фазу формирања полипа као прекурсора, који на крају доводи до стварања инвазивног карцинома (Слика 4). Током овог процеса укључен је низ хистолошких (морфолошких), генетских и епигенетских промена. Велика дужина дебелог црева и његова велика површина континуирано су у контакту са свареном храном, разградним продуктима, различитим хемијским материјама и токсинима, те је на тај начин дебело црево изложено њиховим неповољним утицајима. Време током кога је цревни садржај у контакту са слузницом износи око 6 сати што појачава штетне ефекте бактеријске флоре у дебелом цреву, њен утицај на садржај у лумену и процеси који се у њему одвијају имају штетан утицај на слузокожу. Верује се да већина случајева рака колоне и ректума настаје из бенигних полипа. Ипак, то носи свега 6% ризика за развој колоректалног карцинома, јер је прогресија аденома до карцинома варијабилна, а они углавном задржавају своје бенигне карактеристике. Кроз вишегодишњу акумулацију специфичних генски мутација одговорних за регулацију

раста и диференцијацију у полипу долази до морфолошких измена и инвазије у субмукозу, што представља основу настанка карцинома са метастатским потенцијалом (43).



**Слика 4.** Патогенеза колоректалног карцинома преко полип – карцином секвенце. Различите боје канцерских ћелија (црвена, плава и љубичаста) означавају њихове различите карактеристике. Плавом бојом означен туморски ћелијски клон стекао је инвазивне карактеристике (преузето и адаптирано из Grady WM, 2015).

Полипи су јасно видљиве хиперпролиферације епитела мукозе колона. Морфолошки полипи се по Париској класификацији деле на полипоидне (пендулатне и сесилне) и неполипоидне (флат и улцеративне лезије) које су чешће повезане са субмукозним инвазивним карциномом од пендулантних без обзира на величину (44). У полиподне лезије дебелог црева спадају аденоми, хипепластични полипи, сerratни аденоми, флат аденоми (флат лезије које се тешко виде на рутинској ендоскопији а могу поседовати малигни потенцијал), хамартроматозни и инфламаторни полипи (45).

Постоје две врсте полипа са малигним потенцијалом и то су аденоматозни полип (аденом) и сесилни назупчени полипи, најчешће локализовани у левој половини колона. Аденоматозни полипи се проналазе код четири од десет особа у доби изнад педесет година. Сматра се да 75% карцинома колоректума настаје из аденоматозних полипа (аденома) преко полип канцер секвенце и да више од 90% аденома неће прогредирати у карцином (46).

По дефиницији аденоми су јасно дефинисане масе са клоналном пролиферацијом (бенигни тумори) епителног ткива које увек имају одређени степен дисплазије. Дисплазија високог степена је прекурсор настанка инвазивног карцинома, *in situ* карцином или интраепителна (интрамукозна) неоплазија у којој не постоје знакови инфилтрације мишићног слоја мукозе и ризик за појаву метастаза. Аденоми могу бити тубуловилосни са 25-75% вилосне компоненте, вилосни са више од 75% вилосне компоненте, и тубуларни са мање од 25% вилосне компоненте, посматрано морфолошки. Присуство вилосног елемента и величина аденома су повезани, при чему је 95% аденома испод 20 mm, а већина аденома дебелог црева је малих димензија. Полипи већи од 1 cm, посебно они са вилосном структуром и високостепеном дисплазијом, носе повећан ризик од малигне трансформације. Ови полипи, познати као узнапредовали, захтевају интензивније ендоскопско праћење (47).

Сесилни назупчени полипи су равни полипи са рецкастом архитектуром епитела. У њихову групу спадају хиперпластични полип, сесилни рецкасти аденом/полип (чешћи у десном колону и већи у поређењу са хиперпластичним полипима) и традиционални рецкасти аденом, а сви су повезани са ризиком од развоја инвазивног карцинома. Хиперпластични полипи су најучесталије назупчене лезије, најчешће у дисталном колону и малог промера често мање од 5 mm. У деведесет процената случајева су бенигни (48-50).

Јако је важно, хистолошки прегледом ресецираног полипа, раздвојити ове две групе, јер се данас зна да су, сесилни рецкасти аденом/полип прекурсорске лезије микросателитне нестабилности (енгл. *Microsatellite instability-MSI*) и метилаторског фенотипа CpG острваца (енгл. *CIMP/CpG Island Methylator Phenotype*) пута карциногенезе, док су хиперпластични практично нешкодљиви (48).

Сада су разлике између хиперпластичних и сесилних сератних полипа (SSP или сесилни сератни аденоми) јасне јер се они карактеришу дисторзијом базалних крипти и најчешће су локализовани у десном колону (45).

На њихову малигну природу могу сугерисати немогућност подизања сесилног полипа, кратак и фиксиран сталк полипа, деформације, неправилне контуре, присуство улцерација и ендоскопска димензија полипа (51).

### 1.5.1 Молекуларни путеви колоректалне карциногенезе

И код здравих особа дешавају се мутације током диференцијације и репликације ћелија међутим како оне долазе на површину из крипти и нестају у року од недељу дана нема услова за настанак карцинома (52).

Иако је етиологија колоректалног карцинома недовољно објашњена, сматра се да настаје као последица комплексне интеракције између генетских чинилаца и фактора спољашње средине. То је вишестепени процес у коме инвазивни карцином настаје из ћелија нормалне мукозе колоне, преко формирања аденома. Волгелстеин и Феарон су 1900. године, представили модел вишестепеног развоја карцинома колоректума, према ком се малигнитете дебелог црева развија као последица генетских измена, укључујући активацију протоонкогена, који утичу на раст ћелија, а њихове мутације доводе до појачане ћелијске пролиферације. Истовремено, долази до инактивације тумор супресорних гена, који имају кључну улогу у регулацији ћелијског циклуса. Мутације ових гена нарушавају равнотежу између апоптозе и пролиферације, што резултује неконтролисано деобом ћелија и губитком механизма програмиране ћелијске смрти.

Иако је редослед ових генетских алтерација важан, за развој малигног тумора неопходно је најмање три до четири генетске мутације, према томе значајнија је укупна акумулација мутација него њихов редослед у формирању карцинома. У неким случајевима мутирани тумор супресорни гени испољавају фенотипски ефекат иако су присутни у хетерозиготном стању, тј. неки тумор супресорни гени не показују рецесивност на ћелијском нивоу (50).

Укључивање протоонкогена и инактивацију тумор-супресорских гена, доводи до клоналне експанзије трансформисаних ћелија и развоја канцера, и представља кључне

корак у настанку неопластичног фенотипа који током времена стиче додатне генетичке промене, способност ангиогенезе и инвазивност. Геномска нестабилност настаје као последица постепене акумулације мутација у генима који регулишу пролиферацију и диференцијацију епителних ћелија. Важну улогу у настанку карцинома колоректума имају три пута геномске нестабилности: хромозомска нестабилност (енгл. *CIN/ Chromosomal instability*), микросателитна нестабилност и метилаторски фенотип CpG острваца (53).

#### 1.5.1.1 Традиционални пут

Супресорски или традиционални пут колоректалне карциногенезе установљен је од стране Феарон-а и Вогелстеин-а (50). Заслужан за развој ФАП-а и 60-85% спорадичних колоректалних карцинома је конвенционални модел развоја тумора, који води до настанка хромозомски нестабилних тумора (*CIN* фенотип/енгл. *Chromosomal instability phenotype*), односно преко аденома до микросателитски стабилних (енгл. *Microsatellite instability-MSS*) карцинома (54,55).

Молекуларни образац ових малигнитета одликује хромозомска нестабилност, претежно на: 5q (APC ген/ енгл. *Adenomatous polyposis coli gen*), 8p, 17p (TP53 ген/енгл. *Tumor protein P53, cellular tumor antigen p53 gen*) и 18q, гени DCC (енгл. *Deleted in Colon Carcinoma*), SMAD2/DPC2 (енгл. *Mothers against decapentaplegic homolog 2/Deleted in Pancreatic Cancer-2*) и SMAD4/DPC4 (енгл. *Mothers against decapentaplegic homolog 2/Deleted in Pancreatic Cancer-4*)), која обухвата нестанак или амплификацију хромозома, анеуплоидију, транслокације и недостатак хетерозиготности. Алтерација тумор-супресорског APC гена тј. његова дисфункција омогућава даљу прогресије тумора и настанка канцера, па се сматра главним покретачем у развоју малигнитета (47).

APC супримира β-катенин који контролише миграторну активност (повећава адхезивност ћелија на површини епитела и има улогу у експресији других протеина који стимулишу деобу ћелије). Како ћелије мигрирају ка лумену црева, губитак површних ћелија је неопходан за одржавање равнотеже у продукцији ћелија у базама крипти, активност APC гена се повећава, што доводи до појачане програмиране ћелијске смрти. Уколико је APC регулаторни пут оштећен нема адекватне миграције ћелија ка површини долази до њиховог накупљања што може бити довољно за почетак аденоматозог раста и сматра се раним и иницирајућим догађајем у карциногенези. Ове мутације су честе и код малих бенигних полипа, налазе се код око 80% колоректалних и присутне су у раним стадијумима што је потврђује хипотезу да су повећана адхезивност и губитак апоптозе узроковани оштећењем APC пута (52).

У почетним фазама развоја тумора и у даљем напредовању малигнитета, кључну улогу играју типичне промене протоонкогена K-ras, удружено са губитком улоге гена DCC, SMAD2 и SMAD4, који додатно спречавају програмирану ћелијску смрт, и појављују се у раној фази карциногенезе (47).

Следећи генетски догађај у трансформацији ћелија је активација RAS гена (енгл. *Rat sarcoma*). BRAF (енгл. *B-Raf proto-oncogene*) измене у генима су такође присутне у почетном стадијуму неопластичне трансформације и као и RAS одговорне су за повећање ћелијске пролиферације. Аденоми чије су димензије мање од 10 mm садрже испод 10% K-Ras (енгл. *Kristen rat sarcoma viral oncogen homolog*) или N-Ras (енгл.

*Neuroblastoma rat sarcoma virl oncogene homolog*) мутација које су присутне у више од 50% аденома већих од 1 cm и колоректалном карциному. Њихова појава у каснијим морфолошким стадијумима указује да редослед мутација има значајну улогу у карциногенези колоректалног карцинома.

Са растом аденома долази до губитка дугог крака 18 хромозома (18q) што се налази код 75% колоректалних карцинома, 50% узнапредовалих и само 10% раних аденома и указује да постоје још неки генетски догађаји у морфолошкој прогресији узнапредовалих аденома у рани карцином. Постоје докази да DCC, SMAD4 и SMAD2 и гени на 18q имају улогу у карциногенези. DCC је површни протеин који делује као тумор супресор док су SMAD4 и SMAD2 у интеракцији са трансформишућим фактором раста  $\beta$  (енгл. *Transforming growth factor  $\beta$* ) путем којим супримирају нормалан ћелијски раст и учествују у трансформацији у узнапредовале аденоме.

Следећа фаза у прогресији ка малигнитету је представљена изменама на p53 или нестанком кратког крака на седамнаестом хромозому. Тумор-супресорски ген присутан је у мање од 10% раних стадијума аденома, 30% узнапредовалих аденома и 75% карцинома, који изазива програмирану ћелијску смрт као одговор на оштећење ћелија што сугерише да игра кључну улогу у малигнуј трансформацији ћелија (56,57).

Према томе малигна трансформација тј, прелазак бенигне лезије у инвазивну болест је моменат када се дешава измена на TP53 гену (47).

#### 1.5.1.2 Мутаторски пут

На бази молекуларних обележја колоректални карциноми су подељени на микросателитски стабилне и нестабилне туморе (58). За разлику од хромозомске нестабилности код микросателитске нестабилности нису идентификоване промене у броју и структури хромозома. Микросателитно нестабилни малигнитети се формирају процесом мутаторске карциногенезе. MSI тумори (15%) се карактеришу нарушеним механизмом за корекцију неправилно спарених база у ДНК (енгл. *Mismatch repair Mechanism – MMR*) што доводи до нагомилавања мутација тј. до стварања хипермутираног генома-мутаторни фенотип (54).

MMR беланчевине: MLH1 (енгл. *MutL Homolog 1*), MLH3 (енгл. *MutL Homolog 3*), MSH2 (енгл. *MutS Homolog 2*), MSH3 (енгл. *MutS Homolog 3*), MSH6 (енгл. *MutS Homolog 6*), PMS1 (енгл. *Postmeiotic Segregation Increased 1*) и EXO1 (енгл. *Exonuclease 1*) одређени су генетским секвенцама у оквиру MMR-а. До неправилног рада долази услед деактивација неког од ових гена из MMR система, због соматских и герминативних мутација или је последица епигенетског пригушивања. Протеини MMR система формирају хетеродимерне комплексе који се везују за подручја измењене ДНК и започињу поправку (59). Дефицитарно поправљање погрешно спарених база доводи до варијабилности дужина региона ДНК који се називају микросателити. Микросателити су кратке, поновљене нуклеотидне секвенце у ДНК, дужине 1-6 базних парова који чине 3% хуманог генома (60).

Варијабилност њихових дужина, од ћелије до ћелије, се огледа у њиховом скраћивању и продужењу. У највећем броју случајева долази до промене у дужини динуклеотидних поновака нуклеотида цитозина и аденина. Репликативна грешка доводи до мутација које померају оквир читања што доводи до измене или инактивације важних тумор супресорних гена. Као последица, гени који имају микросателите TGF $\beta$ RII (енгл. *Transforming growth factor  $\beta$  receptor 2*), EGFR (енгл. *Epidermal growth factor receptor*),

Бах (енгл. *Bcl-2 Associated X protein*) су често мутирани код колоректалног карцинома. MSI фенотип је карактеристичан за фамилијарне карциноме. Микросателитна нестабилност такође представља и главну молекуларну карактеристику наследног неполипозног колоректалног карцинома познатог као Линчов синдром и среће се као и узрочни фактор различитих карцинома јајника, желуца и ендометријума (54).

### 1.5.1.3 Метилаторски пут

Очување постојаности генома постиже се метилацијом ДНК, епигенетским процесом који регулише генску активност и доводи до њене супресије. CpG острвца (енгл. *cytosine preceding guanine CpG*) су присутна у преко педесет процената промотоских гена, која су у малигним ткивима метилована, а чине делове генома са мноштвом CpG динуклеотида која су углавном неметилована у здравим ћелијским структурама. „Епигенетска нестабилност“ настаје услед пригушивања генетског преписивања метилованих гена, које је узроковано метилацијом CpG острваца. Аберантна геномска метилација доводи до карциногенезе преко дерегулације експресије кључних гена (61). Метилацијски фенотип CpG секвенци у колоректалном карциному представља карактеристику која доводи до епигенетске нестабилности кроз хиперметилацију промотора и потискивање тумор-супресорских гена, као што је MLH1, један од гена укључених у поправку грешака у ДНК (MMR гена) (62).

Малигнитети формиран на овај начин, са молекуларног гледишта, одликују се великим процентом BRAF мутација до 90%, K-Ras мутација, а могу се јавити као MSS или MSI тумори (63). Патолошки прекурсор у CIMP метилаторском путу је сесилни назубљени аденом, самим тим CIMP тумори исказују своју особеност кроз тип прекурсорске лезије из које се развијају, обликујући тако 'serrated pathway' (64).

„Зупчасти пут“ је посебан начин карциногенезе колона и ректума, у суштини је мутација у BRAF гену, а добио је назив према скупу „зупчастих“ тумора који стичу микросателитску нестабилност и повезани су са прилично убрзаним развојем од прекурсорске лезије до малигнитета. Запажено је да се ова мутација јавља рано у „зупчастом путу“ и да индукује активацију MAPK/ERK (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*) пута са последичном неконтролисаном деобом ћелија. Док су мутације овог гена знатно ређе у конвенционалним аденомима, уочено је да је он мутиран у већини „зупчастих аденома“ (65).

BRAF V600E мутација је снажно повезана са хиперметилацијом MLH1 гена у 20,3% неклаификованих и у 18,7% спорадичних колоректалних карцинома. Хиперметилација MLH1 у MSI-спорадичном колоректалном карциному је нађена у 83-100% случајева (66).

CIMP се може поделити у зависности од нивоа синхроних хиперметилација које се јављају на неколико CpG секвенци локализованих у непосредној близини промоторског региона гена супресора, и то као низак (CIMP-L), висок (CIMP-H) или негативан (CIMP-O) (62). CIMP-H, који се често локализује у проксималном колону, чешће се јавља код жена и у старијем животном добу, показује лошију прогнозу у поређењу са CIMP-L (сродан са K-Ras изменама) и CIMP-O (учестале измене TP53). Мала учесталост мутација TP53 гена и висока учесталост BRAF мутација, уз деактивацију WNT/ $\beta$ -catenin сигналног пута (енгл. *Wingless-related integratio site  $\beta$ - Catetin pathway*), одликују CIMP-H који је учестало присутан у MSI малигнитету на молекуларном



нивоу. Као биомаркер за предвиђање исхода и евалуацију одговора на хемиотерапију код карцинома дебелог црева користи се статус хиперметилације гена из CIMP панела (67).

### 1.5.2 Процес метастазирања

Неконтролисано повећање броја ћелија и преживљавање подстакнути су генетским и епигенетским модификацијама које се нагомилавају у спорадичним, предканцерозним лезијама. Процес који следи је акумулирање инвазивних и метастатских одлика, које омогућавају даље ширење ћелија карцинома. Механизам епително-мезенхимне транзиције (ЕМТ) игра кључну улогу у развоју инвазивног фенотипа, током којег епителне ћелије прелазе у мезенхимални фенотип, што представља сложен ћелијски поступак. Постоје три врсте ЕМТ: а) током ембрионалног раста и органогенезе (68), б) у процесу зацељивања рана и органске фиброзе и ц) за време инвазије карцинома (69).

Трећи тип ЕМТ игра кључну улогу у ширењу туморских ћелија и њиховој способности да продру у околна ткива и формирају метастазе у удаљеним органима тј. повезан је са формирањем продорног и метастатског фенотипа (70). Развој агресивног фенотипа омогућен је „разбијањем“ тесних веза цревног епитела, нарушавањем апикално-базалног поларитета и преобликовањем ћелијског скелета, кроз које карциномске ћелије пролазе за време ЕМТ-а. ЕМТ пружа карциномским ћелијама могућност адаптације кроз константне измене туморске микросредине и на крају ширење, јер је у ћелијама карцинома абнормално регулисана ванћелијским стимулусима туморске микросредине, обухватајући факторе раста и запаљенске цитокине, као и унутартуморске изазиваче попут хипоксије (71). Процес ЕМТ подразумева временски координисану сарадњу комплексне мреже молекуларних сигналних путева и регулатора, при чему TGF $\beta$  и WNT / $\beta$ -catenin сигнални каскадни механизми играју кључну улогу у иницирању епително-мезенхимне транзиције. Ови елементи су разврстани у три категорије: ЕМТ ефектори-ефекторни молекули који спроводе ЕМТ програм, ЕМТ регулатори-транскрипциони фактори који контролишу ЕМТ програм и ЕМТ стимулатори –екстрацелуларни сигнали који покрећу ЕМТ сигнал (72).

## 1.6 Клиничка презентација колоректалног карцинома

Са дијагнозом се због не убедљиве клиничке презентације на почетку болести често касни, разлог лежи у спором расту, тако да колоректални карцином пре појаве симптома може бити и до пет година присутан. У зависности од примарне локализације карцином колоректума ће се манифестовати одређеном групом симптома, за разлику од оних са асимтоматском клиничком сликом који углавном имају окултно крварење које је пропорционално величини као и степену егзулцерисаности тумора (73). Разлика у морфолошкој структури тумора у проксималном и дисталном делу дебелог црева, може да укаже на врсту симптома болести који су у вези са локализацијом тумора (74).

Пре него што се симптоми појаве, малигнитет проксималног, односно десног колона, који захватају цекум, асценденс и трансверзум, морају достићи већи раст у поређењу са колоректалним карциномом сигме и ректума. Тумор проксималне половине дебелог црева је пролиферативан, егзофитичног раста који не прати раст строге па су крвни судови фрагилни и окултно крварење доводи до малокрвности (75). Најзаступљенији симптоми проксималног дела дебелог црева су последица малокрвности услед недостатка гвожђа и презентују се општим симптомима као што су слабост, недостатак

даха и бол у грудима. Ретко се столица због крварења из тумора проксималног колона презентује као „махациони“ фецес. Нелагодност у абдомену и палпабилна маса могу се појавити са повећањем тумора. Илеус танког црева може настати услед блокаде баухинијеве валвуле, проузрокован малигнитетом у цекуму, иако зачепљење лумена није типично за колоректални карцином ове регије због већег радијуса цекума и асценденса (76,77).

Карциноми левог колона кога чине сигма и десценденс често инфилтришу цео обим зида црева узрокујући опструктивне сметње јер је пречник дебелог црева у овом делу мањи поређењем са проксималним колоном. Запаљење перитонеума је изузетно ретка последица карцинома и по правилу се догађа због перфорације зида колона, углавном у цекуму (78). После јела могу се јавити абдоминални болови карактера колике као и промене у цревном пражњењу. Абдоминалне колике нагло почињу са пропагацијом јаких болова који се пропагирају дуж колона до места стенозе-Дувалове колике. Некада у дугом периоду је присутан затвор, са повременим сменом течних столица са малом количином фецеса. Свежа крв помешана са столицом претежно се виђа код колоректалног карцинома левог колона и правог црева самим тим хематохезија је учесталија у дисталном позиционирању тумора. Услед суженог лумена црева столица поприма облик оловке (76,40).

Карциноми право црева могу инфилтрисати околне структуре као што су зид мокраћне бешике, вагине и нерве, резултујући перинеалним или сакралним болом, али у одмаклој фази болести. Знатно учесталији су опструктивни симптоми, промене у пражњењу црева укључујући затвор, течне столице, лажне позиве на столицу тј. тенезме или хитне позиве на столицу тј. ургенције (76,79).

Код младих треба прићи са посебном пажњом ако су симптоми присутни а припадају групи са високим ризиком обољевања, нарочито они са позитивном породичном анамнезом и дуготрајном историјом инфламаторних болести црева због све веће инциденце малигнитета колона и ректума у млађој популацији. Малокрвност се код старијих веома често доводи у везу са малокрвности у хроничним болестима, међутим на тумор колона посебно код оних преко 40 година увек треба размишљати ако се јаве хематохезије или анемија услед недостатка гвожђа. Зато што диференцијално дијагностички долазе у обзир многа обољења, клиничка слика може бити погрешно протумачена и то као, дивертикулоза колона која се манифестује абдоминалним болом, присуством крви у столицу, променама у пражњењу црева, иритабилна болест црева, абдоминалне колике са променом у цревном пражњењу али и хемороиди са ректалним крварењем (77,80).

Дијагноза у случају ургентне презентације типа перфорације, опструктивног илеуса или великог крварења биће постављена на операционом столу јер су то индикације за неодложну хируршку интервенцију. Код старијих особа је нарочито изражено присуство сидеропенијске анемије због дефицита гвожђа, коју хематолошке анализе у крвној слици учестало показују (81).

У случају секундарних депозита, вредности биохемијских параметара су увећане, међутим не морају се поклапати са макроскопским налазом на јетри. Вредности директног и укупног билирубина, трансаминаза, алкалне фосфатазе и гама-глутамилтрансферазе, као биохемијских параметара функције јетре, обично су у референтним границама. Понекад је повишена и лактатна дехидрогеназа, а електролитни поремећај изазван дуготрајном дијарејом се мора кориговати (82). Степен раширености тумора, туморска локализација и клиничка презентација болести показују



статистички значајну повезаност. Тако микровкрвност, болови и ургентна презентација су повезани са вишим TNM стадијумом (карактеристика примарног тумора-T, статуса лимфних чворова-N и евентуалног присуства метастаза-M), док су крв у столицу и лакализација у дисталном делу дебелог црева са нижим TNM стадијумом (75). Крв у фецесу и промене у пражњењу црева значајно корелирају са колоректалним карциномом леве стране, према истраживањима, док је микроцитна анемија чешће повезана са тумором десног колона. Клиничка презентација обухвата болове у стомаку, присуство свеже крви у фецесу или промене у пражњењу црева код 50-70% оболелих, док се код око 30% пацијената дијагноза открива случајно (74).

## 1.7 Класификација колоректалног карцинома

У циљу одређивања стадијума тумора предложени су бројни класификациони системи, али се најчешће користе Дуке класификација (83), TNM класификација Светске здравствене организације и Astler-Coller класификација (84). С обзиром на то да је преоперативно одређивање TNM стадијума комплексно, савремена TNM класификација се ослања како на преоперативне клиничке налазе, тако и на оперативне налазе, уз детаљну патохистолошку анализу ресеката. Овај систем обухвата процену на основу особина примарног тумора (T), статуса лимфних чворова (N) и могућег присуства метастаза (M) (85).

Особине примарног тумора дефинише степен инфилтрације зида дебелог црева, без обзира на његове димензије. За квалитетну процену стадијума саветује се испитивање најмање дванаест регионалних лимфних жлезда, при чему лимфнодални статус приказује погођеност тих жлезда и број оних које садрже депозите (86). Пuteви ширења колоректалног карцинома укључују лимфогени и хематогени пут, као и ширење *per continuitatem* на суседне структуре као што су танко или дебело црево, мокраћна бешика, материца, или трансцеломично. С обзиром да највећи део венске крви из дебелог црева одлази у портну вену, најчешће метастазе су у јетри (87). Метастазе ретко погађају панкреас и срце, док чешће захватају лимфне чворове, мозак, слезину, кости, перитонеум и плућа, а начин метастазирања условљен је хистолошким типом малигнитета дебелог црева (88). Лимфогени пут ширења је присутан код 40-70% колоректалних карцинома, а захваћени лимфни чворови обично прате крвне судове. Код карцинома ректума, обично су захваћени параректални лимфни чворови, чворови на бифуркацији доње мезентеричне артерије, хипогастрични и пресакрални лимфни чворови. Дисеминацијом путем крвотока обично настају депозити у јетри, плућима и костима. Према TNM систему, стадијум малигнитета се утврђује и обележава у оквиру од I до IV (89).

Према хистопатолошком налазу откривају се метастазе у дисталним органима, што искључиво утврђује патолошки M (pM) (90). Потребно је утврдити да ли депозити операбилне или не, уколико су једино присутни у јетри. Операбилне метастазе се јављају у око 20-25% случајева, а њиховом ресекцијом се постиже петогодишње преживљавање у 27-30% случајева, док је десетогодишње преживљавање забележено у око 20% случајева (89).

О постојању и важности микрометастаза у лимфним жлездама код карцинома дебелог црева воде се бројне расправе у протеклим годинама. Рутинска истраживања заснована

на H&E бојењу и имунохистохемијској детекцији микрометастаза нису показала значајан клинички значај; међутим, сугерише се да окултне промене, откривене молекуларним техникама попут RT-PCR, могу бити повезане са лошом прогнозом (91). Док се не постигне коначни консензус око микрометастаза, препорука је да се истолошки идентификовани туморски фокуси величине од 0,2 mm до 2 mm класификују као микрометастазе и означе са pN1 (mi) и pN2 (92).

2 Тачна преоперативна процена малигне болести је посебно важна јер омогућава планирање и евалуацију оперативног лечења. Разликујемо два типа одређивања стадијума болести: а) клинички – када лекар на основу прегледа, биопсије и спроведених визуелизационих дијагностичких техника даје процену проширености малигне болести и б) патолошки – тачније и детаљније након спроведене хируршке интервенције (93).

Одређивање стадијума колоректалног карцинома започиње клиничком дијагностиком, затим следи хируршка интраоперативна процена, а коначни стадијум се утврђује патолошким анализама после операције. У процени начина лечења највећи значај има клиничко-дијагностички стадијум туморске болести, док су хируршки и патолошки стадијум важни за дефинисање постоперативног третмана (94).

## 1.8 Патолошки стадијум колоректалног карцинома

Механизми који надгледају степен продора тумора и секундарне депозите обухватају систематизацију по TNM, Dukes-у и Astler-Coller-у, који су међу најчешће примењиваним методама за класификацију малигнитета дебелог црева (95).

Образац раста и макроскопски изглед карцинома дебелог црева разликују се, иако сви настају од једне злоћудно трансформисане ћелије. Тумори проксималног дела дебелог црева обично су полипоидног изгледа, са тенденцијом раста у лумен, што може довести до његове потпуне оклузије. С друге стране, карциноми дисталног дела дебелог црева су инфилтративно-улцеративне лезије које у виду прстена сужавају лумен и захватају читаву циркумференцију зида, дајући клиничку слику илеуса. Оба типа су локално инфилтративна (96).

2 Мишићни слој зида црева представља кључни критеријум за стадирање тумора према Dukes-овој класификацији, према томе инвазивна форма карцинома дебелог црева инфилтрише зид испод мишићног слоја слузокоже. Још 1932. године, Dukes је дефинисао систем за процену патолошког стадијума болести и поделио туморе на групе А, В, С и D (97). Тумори који нису дали депозите у регионалне лимфне жлезде, не погађају или не инфилтришу мишићни слој зида црева и ограничавају се на слузницу и подслузницу, спадају у групу А. Тумори који нису дали депозите у регионалне лимфне жлезде, али су у целости инфилтрисали зид црева и периколично (периректално) масно ткиво, сврставају се у групу В. Група С обухвата туморе који су дали метастазе у регионалне лимфне чворове, док група D укључује туморе са удаљеним метастазама. Значајан предиктивни фактор, независно од статуса регионалних лимфних жлезда, јесте укљученост мишићног слоја у зид црева (96).

Ради прецизнијег одређивања стадијума тумора, Astler и Coller су 1954. године изменили Dukes-ову класификацију (98), тако да су Dukes-ову групу В поделили на

подстадијуме B1 и B2. У фази B2, тумор продира кроз ламину мускуларис проприје, док је у фази B1 тумор на њу ограничен. Стадијум C1 означава туморе који инфилтришу мишићни слој проприје, али је не пробијају, а метастазирали су у регионалне лимфне чворове. У стадијум C2 убрајају се тумори који су дали депозите у регионалне лимфне жлезде и пробијају мишићни слој проприје (99).

## **1.9 Лечење колоректалног карцинома**

Упркос чињеници да је карцином колоректума традиционално лечен хируршким путем, у последњим деценијама дошло је до проширења терапијских стратегија. Оне сада укључују радиотерапију и неоадјувантну и адјувантну хемиотерапију, са циљем побољшања исхода и квалитета живота пацијената који су подвргнути операцији. Уклањање солитарних метастаза у јетри и плућима такође има важну улогу у терапији и унапређењу квалитета живота код пацијената са ограниченом метастатском болешћу (100-102). Прецизно одређивање стадијума карцинома колоректума игра кључну улогу у избору терапијског плана и прогнози болести (100,101)

### **1.9.1 Радиотерапија**

Радиотерапија се може применити у различитим фазама лечења колоректалног карцинома, укључујући преоперативну, постоперативну, комбиновану која укључује пре- и постоперативну, као и у куративне и палијативне сврхе. Код колоректалног карцинома, примарна улога радиотерапије је да смањи ризик од локалног рецидива након операције, нарочито у пацијената у II и III стадијуму болести. Преоперативна радиотерапија се примењује у случајевима када је потребно смањити величину тумора и његову агресивност. Ово је нарочито важно за туморе са T3 и T4 статусом, јер омогућава радикалну хируршку интервенцију са већом вероватноћом потпуног уклањања тумора (103,104).

### **1.9.2 Хемиотерапија и генетско тестирање**

Иако наизглед идентични, колоректални карциноми показују велику различитост у погледу клиничког тока болести, прогнозе и осетљивости на лечење. Детаљно разумевање молекуларно-генетских карактеристика карцинома колоректума је кључно. Стручњаци препоручују вршење следећих анализа на туморском ткиву код пацијената са метастатским колоректалним карциномом:

1. Анализа мутација у K-Ras и N-Ras генима;
2. Анализа мутација у BRAF гену;
3. Провера микросателитске нестабилности (MSI).

Овакве анализе омогућавају класификацију колоректалног карцинома у различите молекуларно-генетске групе, које могу укључивати:

- Метастатски колоректални карцином без мутација RAS
- Метастатски колоректални карцином са мутацијом RAS;
- Метастатски колоректални карцином са мутацијом BRAF;

- Метастатски колоректални карцином са присутном микросателитском нестабилношћу (MSI).

Ови молекуларни маркери имају како прогностичку тако и предиктивну важност, јер одређују која ће системска терапија бити најефикаснија за туморе сензитивне на одређене лекове (105).

Хемиотерапија је од суштинског значаја у лечењу колоректалног карцинома, а њен главни задатак је индуковање апоптозе–програмиране смрти туморских ћелија. Механизам дејства многих хемиотерапеутских лекова укључује активацију унутрашњег митохондријалног пута који доводи до апоптозе. У овом процесу, каспазе, група протеолитичких ензима, имају кључну улогу у разлагању малигних ћелија. Каскада реакција које каспазе покрећу осигурава елиминацију туморских ћелија без изазивања упале у организму (106).

Неопластичне ћелије карактеришу повећана способност размножавања и отпорност на апоптозу, што је често последица неравнотеже између проапоптотичних и антиапоптотичних протеина. Антиапоптотични протеини, инхибирајући ослобађање молекула који покрећу процес апоптозе као што је Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*), и омогућавају опстанак ћелија очувањем интегритета митохондријалне мембране. Супротно томе, проапоптотични протеини, као што су Бах и Бах (енгл. *Bcl-2 homologous antagonist killer*), покрећу процес апоптозе тако што нарушавају структуру спољашње мембране митохондрија, формирајући поре које омогућавају ослобађање фактора који активирају каспазе, чиме се покреће каскада протеолитичких реакција које резултирају смрћу ћелије. Одређени хемиотерапеутски лекови остварују своје дејство онемогућавајући интеракцију Bcl-2 са Бах и Бах, што покреће програмирану смрт малигних ћелија (107).

Хемиотерапија се може употребити као неoadјувантна или преоперативна и као адјувантна или постоперативна терапија. Сврха адјувантне хемиотерапије је да смањи вероватноћу за поновну појаву болести и продужи преживљавање пацијената са карциномом колоректума. Овај облик системске терапије препоручује се након примарне хируршке ресекције тумора, а пожељно је да се започне у што краћем року, идеално између треће и осме недеље после операције. У случају минимално инвазивне колектомије, постоперативна хемиотерапија се може започети чак и раније (108).

Критеријуми за одређивање високог ризика код пацијената у стадијуму II колоректалног карцинома су општеприхваћени и обухватају следеће: лоша диференцијација тумора (G3), мање од 12 прегледаних лимфних чворова, присуство лимфоваскуларне или продор у нервне структуре, као и клиничке компликације као што су опструкције или перфорације, уз pT4 статус што одговара инфилтрацији малигнитета у околне структуре. Постоперативна хемиотерапија је стандардни облик терапије који се препоручује свим пацијентима у стадијуму III, било који T, N1, M0 или било који T, N2, M0, као и пацијентима у стадијуму II са високим ризиком за прогресију болести (109).

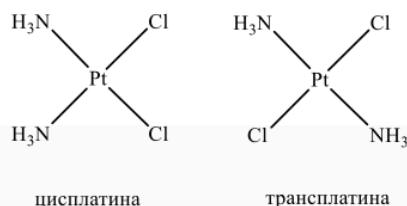
Петогодишње преживљавање код пацијената који су били подвргнути хируршком лечењу колоректалног карцинома значајно се побољшало од деведесетих година, када је износило око 50%, до данас, када достиже 70%. Овај напредак у преживљавању највише се приписује увођењу адјувантне хемиотерапије након операције. Према смерницама за лечење, адјувантна хемиотерапија уобичајено подразумева 5-флуороурацил (5-ФУ) и леуковорин код оболелих у другом стадијуму болести и



значајним ризиком. У стадијуму III болести, као и код пацијената са удаљеним метастазама, користе се флуоропиримидини попут капецитабина, уз додавање иринотекана или оксалиплатина ради постизања бољих терапијских исход (109). До значајног побољшања стопе преживљавања пацијената са карциномом колоректалним довело је увођење оксалиплатине, нарочито у адјувантној и палијативној терапији. Међутим, један од главних изазова у лечењу овим цитостатиком је развој резистенције на лек код око 40% пацијената, која ограничава ефикасност оксалиплатине и представља препреку у дугорочном одржавању терапијског успеха (110). Нежељена дејства попут сензорне неуропатија заједно са кумулативном неуротоксичношћу, представља значајан изазов у лечењу колоректалног карцинома и ограничавају дугорочну примену оксалиплатине, што је подстакло развој нових терапијских стратегија (111). Имунотерапију која укључује антитела усмерена против фактора раста могу примати пацијенти са удаљеним и ресектабилним метастазама у јетри. Два најчешћа типа антитела која се користе су: Бевацизумаб (антитело против васкуларног ендотелијалног фактора раста - VEGF) и Цетуксимаб (антитело против епидермалног фактора раста – EGF) (109).

#### 1.9.2.1 Антитуморска активност комплекса

Розенберг је 1965. године током проучавања деобе бактерије *Escherichia coli* под утицајем сунчеве светлости и амонијум хлорида први открио цитотоксични потенцијал цисплатине (*cis*-диамминдихлоридоплатина(II)), познате као *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. Случајно је синтетисао овај платински комплекс који је касније постао познат као цисплатина (Слика 5), значајан цитотоксични агенс који је нашао примену у лечењу различитих врста малигних тумора (122). Једињење *cis*-диамминдихлоридоплатина(II), познато као цисплатина или *cis*-DDP/CDDP, представља кључног представник прве генерације платинских антитуморских комплекса. Њена примена у хемиотерапији датира још од 1970-их година, када су први пут тестиране њене антитуморске способности. До данас, цисплатина остаје један од најзаступљенијих лекова у лечењу различитих врста карцинома. Ипак, упркос својој ефикасности као антитуморски агенс, цисплатина има одређене недостатке, што је мотивисало научнике да истражују и развијају нова платинска једињења са смањеном токсичношћу и побољшаном селективношћу према биомолекулима, попут нуклеинских киселина. Цисплатина има квадратно-планарну структуру као *cis*-диамминдихлоридоплатина(II). Поред овог *cis*-изомера, постоји и *trans*-изомер, за који је утврђено да не показује антитуморску активност (113).



**Слика 5.** Структурне формуле цисплатине и трансплатине (преузето из Soldatović Tanja. *Mehanizmi neorganskih reakcija*. Državni univerzitet u Novom Pazaru, 2024.).

Иако је цисплатина један од најчешће коришћених антитуморских агенаса, њена примена је ограничена због бројних недостатака. Ти недостаци укључују изражена нежељена дејства, као што су нефротоксичност, ототоксичност и неуротоксичност, затим развој резистенције код туморских ћелија, њена ниска растворљивост у води, као и чињеница да се може примењивати само интравенским путем. Ови изазови подстакли су истраживања у циљу развоја нових, ефикаснијих платинских комплекса са побољшаним профилем дејства и смањеним токсичним ефектима (Слика 6) (114). Тренутно се истражује преко 28 различитих платинских комплекса, али само неки од њих су уведени у клиничку праксу, укључујући цисплатину, карбоплатину и оксалиплатину (114,115). Оксалиплатина је одобрена за медицинску употребу 2002. године, међутим много раније још 1989. године је карбоплатина је званично ушла у клиничку примену. Поред ових лекова користе се углавном у земљама Азије, платински комплекси као што су недаплатина, лобаплатина и хептаплатина (116).

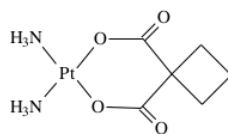
Цисплатина припада првој генерацији платинских комплекса. Њена структура укључује два хлоридна лиганда, који су релативно нестабилни и могу се одвојити од комплекса, као и два монодентатна амино лиганда која формирају стабилне везе (117). Може бити примењена самостално или у комбинацији са другим цитостатским средствима (118). Цисплатина се користи у лечењу тумора врата, јајника, главе, тестиса, плућа материце и бешике (119,120). Ипак, због појаве резистенције након вишекратне примене њена ефикасност у терапији леукемија, тумора гастроинтестиналног тракта и тумора бубрега је ограничена (121).

Платински комплекси који имају антитуморску активност зависе од њихове структуре, што су показала бројна истраживања. Ови комплекси се могу описати општом формулом  $cis-[PtA_2X_2]$ , где  $A_2$  представља два инертна азотна лиганда (који могу бити монодентатни или бидентатни), док  $X_2$  представља два лабилна лиганда. Комплекси платине друге генерације, попут карбоплатине, развијени су са циљем да побољшају ефикасност и смање токсичност у поређењу са цисплатином. У овим комплексима, хлоридни лиганди су често замењени стабилнијим групама као што су 1,1-циклобутил, карбоксилат, или гликолат. Осим тога, неки комплекси садрже 1,2-диаминоциклохексан (DACH) као инертни лиганд, док други користе сулфате, малонате и сличне супстанце као одлазне лиганде. Таква промена у структури често повећава стабилност и селективност лека, чинећи ове комплексе ефикаснијим у циљаној хемиотерапији (113).

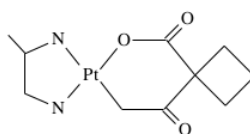
**2** Карбоплатина (1,1'-*cis*-циклобутилдикарбоксилатодиаминоплатина(II)) садржи један бидентатни дикарбоксилатни лиганд уместо два монодентатна хлоридна лиганда. Иако је мање **2** активан у поређењу са цисплатином, карбоплатина се карактерише значајно нижом токсичношћу и не захтева форсирану диурезу, што олакшава њену употребу и омогућава примену у амбулантним условима (122). Њене индикације су сличне као код цисплатине (123). Најчешће нуспојаве укључују мучнину, повраћање и супресију коштане сржи (124). Други деривати друге генерације платинских комплекса укључују зениплатину, енлоплатину, CI 973, лобаплатину, SKI 2053, недаплатину **2** хептаплатину (125). Лобаплатина је у употреби за лечење малигнитета дојке (126). У поређењу са карбоплатином, **недаплатина** је ефикаснији, боље растворљива и мање токсична за бубреге и коштану срж, и одобрена за лечење карцинома једњака, желуца, јајника, плућа, као и тумора главе и врата (127). У терапији карцинома желуца хептаплатина је пронашла примену (128).

Трећу генерацију платинских антитуморских комплекса чине једињења чија структура укључује октаедрални Pt(IV) јон. Ови комплекси се могу формулисати као *cis*-[PtA<sub>2</sub>X<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>], где Y<sub>2</sub> представља два лабилна монодентатна лиганда или један лабилни бидентатни лиганд. Током њихове примене, редукција јона Pt(IV) ослобађа аксијалне лиганде Y<sub>2</sub>, што активира њихово антитуморско дејство. У ову групу такође спадају нови комплекси са *trans* геометријом, полинуклеарни платински комплекси, као и они који садрже лиганд са асиметричним угљениковим атомом, што омогућава већу разноврсност у интеракцијама са биомолекулима и повећава терапеутски потенцијал. Ови нови облици комплекса имају за циљ да побољшају ефикасност и смање нежељене ефекте у односу на претходне генерације платинских лекова (113).

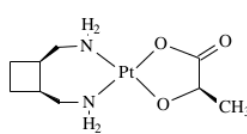
<sup>2</sup> Оксалиплатина (*cis*-оксалато-*trans*-1,2-диаминоциклохексан-платина(II)) је део групе алкилишућих агенаса, који показује цитотоксично дејство без обзира на фазу ћелијског циклуса, кроз формирање ДНК-адуката. Као платински дериват треће генерације, одликује се врло малим нефротоксичним ефектима, али је карактеристичана по неуротоксичности, која се испољава у виду парестезије и дизестезије у регији шака, стопала и око очију. Такође, неуротоксичност у пределу грла (фаринго-ларингеална дизестезија) може изазвати осећај гушења (129). Синтетисан је први аналог цисплатине који се може примењивати *per os* и користи се у лечењу карцинома колоректума и леукемијских ћелија (130). Нежељени ефекти укључују ототоксичност, замор, неутропенију и неуропатије (131,132).



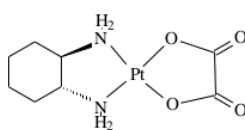
Карбоплатина



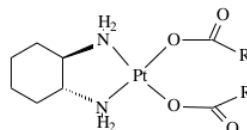
NK 121



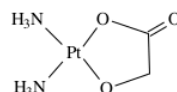
Лобаплатина



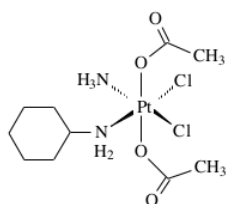
Оксалиплатина



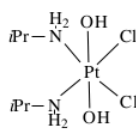
L-NDDP



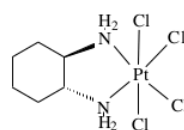
Недаплатина



JM-216



Ироплатина

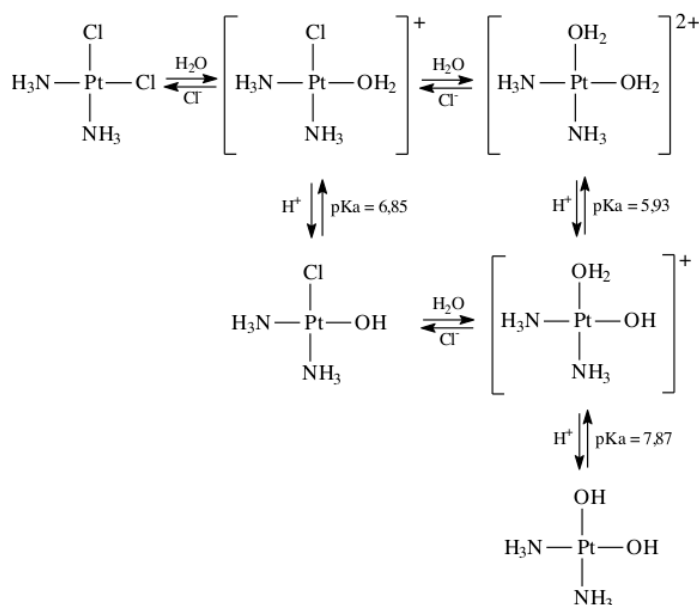


Ормаплатина



**Слика 6.** Комплекси платине(II) и платине(IV) који поседују антитуморску активност (преузето из Soldatović Tanja. *Mehanizmi neorganskih reakcija*. Državni univerzitet u Novom Pazaru, 2024. ISBN 978-86-81506-25-7).

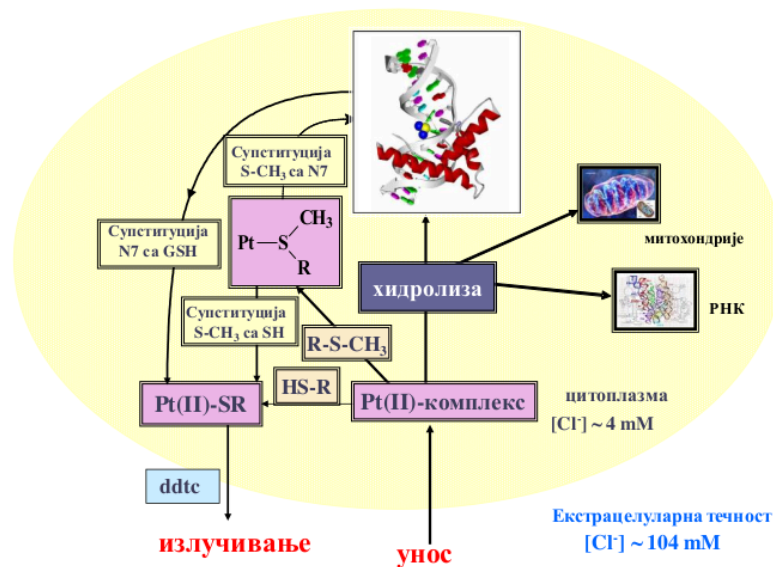
Антитуморски механизам деловања платинских комплекса заснива се на њиховој способности да интерагују са ДНК молекулама, чиме се инхибирају процеси репликације и транскрипције, што доводи до заустављања неконтролисаног дељења ћелија. Када се ови комплекси унесу у организам, покрећу се различити физиолошки процеси који утичу на њихову ефикасност и токсичност. Примарни ефекат платинских комплекса настаје захваљујући њиховој способности да замене своје лиганде са другим молекулама у организму, чиме се појачава њихова интеракција са биомолекулама, попут ДНК. Један од кључних механизма токсичности и развоја резистенције јесте везивање платинских комплекса за аминокиселине као што су цистеин, метионин, L-цистеин или глутатион, што може проузроковати нежељене ефекте, укључујући нефротоксичност, ототоксичност, неуротоксичност и кардиотоксичност. Такође, цисплатина се након уношења у крвоток везује за разне протеине као што су албумин, трансферин, и γ-глобулин, као и за мале фракције у еритроцитима. Везивање ових протеина доводи до деактивације лека, јер је овај процес неповратан. Ови физиолошки механизми значајно утичу на активност и ефикасност платинских комплекса у терапији, те је важно предвидети ове процесе како би се постигла оптимална концентрација активног лека у циљним ткивима (113).



**Схема 1.** Хидролиза цисплатине (преузето из Soldatović Tanja. *Mehanizmi neorganskih reakcija*. Državni univerzitet u Novom Pazaru, 2024.).

Хидролиза цисплатине у телу се одвија услед разлике у концентрацијама хлоридних јона унутар и ван ћелије. У екстрацелуларној течности, где је концентрација  $\text{Cl}^-$  јона висока (око 100 mM), хидролиза цисплатине је успорена (Схема 1). Насупрот томе, унутар ћелије, где је концентрација хлоридних јона нижа (око 4 mM), овај процес је убрзан. Ова разлика у концентрацијама омогућава бржу конверзију цисплатине у реактивније аква-хлоридо комплексе, који су значајно реактивнији у поређењу са дихлоридо комплексима. Реактивност ових комплекса зависи од pH вредности и концентрације  $\text{Cl}^-$  јона у окружењу. Комплекси платине морају имати прецизну равнотежу између реактивности и инертности, јер ће превише инертни или превише реактивни комплекси бити мање ефикасни у лечењу. Способност ових једињења да се селективно вежу за одређене биомолекуле представља кључни аспект њихове антитуморске активности и предмет је бројних истраживања (113).

Антитуморско дејство платинских комплекса, као што је цисплатина, не настаје директним везивањем за ДНК у једру ћелије. Постоји могућност да се ови комплекси вежу за митохондријалну ДНК, која се наслеђује искључиво по мајчиној линији, али је утврђено да ова интеракција има мањи утицај на антитуморску активност платинских једињења. Када цисплатина досегне молекул ДНК, њена способност за координацију је ограничена. Након хидролизе, цисплатина првенствено делује везивањем за N7 атом гуанина, док је везивање за аденин и цитозин мање изражено. Приближно 60–65% веза које цисплатина формира у ДНК односе се на 1,2-(GpG) комплекс између два гуанина, а око 20–25% веза формира се са аденином и гуанином у облику 1,2-(ApG) комплекса. Остале врсте веза, као што су монофункционалне или 1,3-(GpG) везе, мање су присутне. Ови комплекси блокирају репликацију и транскрипцију ДНК, чиме се спречава дељење туморских ћелија, што доводи до њихове смрти. Овај механизам је кључан за дејство цисплатине, али такође објашњава и појаву резистенције малигнитета на хемиотерапију и поједине нус појаве (113).



**Слика 7.** Унутарћелијски процеси приликом примене антитуморских агенаса на бази платине (преузето из Soldatović Tanja. *Mehanizmi neorganskih reakcija*. Državni univerzitet u Novom Pazaru, 2024.).

Када лек уђе у организам, најчешће путем интравенске примене, почиње низ процеса који доводе до његовог дејства (Слика 7). Платински агенси, међутим, могу реаговати не само са ДНК, већ и са другим биомолекулима у организму, што је често повезано са појавом токсичних ефеката. Платина(II) има висок афинитет према молекулима који садрже сумпор, као што су протеини и пептиди који у свом саставу имају L-цистеин или L-метионин. У интрацелуларној течности, концентрација тиола (попут L-цистеина и глутатиона) износи око 10 mM, што омогућава платинским агенсима да најпре реагују са овим сумпорним нуклеофилима, пре него што формирају стабилније везе са ДНК (113).

Интеракције између платинских комплекса и молекула који садрже сумпор имају кључан значај за дејство лека. Када је реч о тиоестерима, Pt-S веза може се раскинути у присуству ДНК, што омогућава да N7 атом гуанозин-5'-монофосфата замени тиоестер. Тиоли, међутим, формирају изузетно стабилне Pt-S везе, које су у већини случајева нереактивне. Ове стабилне везе могу деловати као „резервоари“ платине у организму, али такође могу допринети деактивацији платинских комплекса, што резултује токсичним ефектима. Да би се разложиле ове стабилне везе, могу се користити нуклеофили са сумпором, као што су диетилдитикарбамат (DDTC), тиоуреа, фуколамин или глутатион, који могу смањити токсичност и повећати ефикасност лечења (113).

Цисплатина је неселективан лек, што значи да делује и на туморске и на здраве ћелије, а ефекат зависи од дозе. Са повећањем дозе расте и токсичност лека. Управо је токсичност највећи ограничујући фактор за клиничку примену цисплатине (133). Предозирање цисплатином може довести до акутног отказивања виталних органа, а за овај лек не постоји специфичан антидот (134). Елиминација цисплатина одвија се у две фазе – почетно полувреме елиминације траје између 10 и 20 минута, док терминална фаза траје од 32 до 53 минута. Процес уклањања укупне количине платине из организма након једне дозе лека одвија се у три фазе: прва траје око 14 минута, друга 274 минута, док последња фаза може трајати до 53 дана (135).

- На развој ототоксичности утиче оксидативни стрес и повећана активност NADPH-оксидазе у кохлеарном региону (136). Ототоксичност се јавља код 20-50% одраслих пацијената, док је код деце тај проценат већи, достигавши чак и до 50%, иако мање честа, може довести до озбиљног оштећења слуха (137).
- Овај лек делује директно токсично на кардиомиоците и индиректно, преко повећања продукције слободних радикала и изазивања оксидативног стреса (138). Оштећење миокарда може бити откривено повишеним нивоима срчаног макера тропонина, док оштећење ДНК у кардиомиоцитима доводи до пораста малониладехида и лактатдеhidрогеназе у срчаном ткиву, као и до смањења антиоксидативних молекула, као што су глутатион и супероксид дисмутаза (139). Симптоме су промене на ЕКГ-у, бол у грудима, инфаркт миокарда, нестабилан крвни притисак, аритмије, кардиомиопатија, миокардитис и срчана инсуфицијенција (140,141).

- Хепатотоксичност се обично јавља када се примењују високе дозе лека, с обзиром на то да се део цисплатина елиминише преко жучи (142,143). Оксидативни стрес има значајну улогу у развоју овог стања, јер доводи до снижења активности глутатион редуктазе и повећава ниво малонилдехида у јетри (144). Патохистолошки прегледи јетре откривају дегенеративне промене, апоптозу хепатоцита и инфилтрацију ћелијама запаљења (145). Ова врста токсичности праћена је повећањем нивом трансаминаза у серуму, а у неким случајевима и билирубина (143).
- Нефротоксични ефекти могу бити акутни или хронични. Акутна нефротоксичност се огледа у смањењу бубрежне васкуларизације и паду нивоа електролита као што су калијум, калцијум и магнезијум (146). Хронични ефекти зависе од дозе – мање дозе смањују клиренс креатинина, док веће дозе утичу на смањење гломеруларне филтрације, слабију тубуларну реасорпцију и појаву протеинурије (147). Објашњење лежи у чињеници да цисплатина достиже највећу концентрацију у бубрезима, где се примарно елиминише у року од пет дана након примене, што објашњава појаву нефротоксичности код око 20% пацијената. Лек се акумулира у епителним ћелијама бубрега у нивоима који су до пет пута виши него у серуму, чиме се додатно појачава његова токсичност (148,149). Главни узрок нефротоксичности је оксидативни стрес и повећана производња реактивних кисеоничких радикала (150,151). Пероксинитрит, реактивни азотни радикали, доводе до оштећења протеина, пероксидацијом липида и оштећењем молекула ДНК-а, што ослабљује ћелијске механизме одбране (152). Такође, хиперурикемија као последица ћелијског распада доприноси токсичним ефектима цисплатине на бубреге (153).
- Цисплатина негативно утиче на коштану срж, што доводи до супресије њене функције, потенцијално узрокујући панцитопенију, што повећава ризик од крварења, инфекција и развоја малокрвности (154). Не препоручује се планирање потомства током терапије и шест месеци након завршетка лечења јер употреба током трудноће може резултирати губитком плода или ембриотоксичним ефектима (155).

Модерна истраживања у области хемиотерапије усмерена су на развој нових платинских комплекса и унапређење ефикасности постојећих, с циљем смањења токсичности и спречавања резистенције коју туморске ћелије развијају. Посебан акценат је стављен на модификације комплекса прве, друге и треће генерације, како би се побољшала њихова селективност према ДНК и тиме појачала антитуморска активност. Истражују се и механизми интеракције платинских лекова са другим биомолекулима у организму, што је важно за смањење нежељених ефеката и побољшање ефикасности у онколошкој терапији.

Један од кључних праваца истраживања је развој нових платинских комплекса са већом селективношћу према ДНК, док се паралелно проучава механизам раскида стабилних Pt-S (тиол) веза, што има за циљ унапређење делотворности ових лекова.

Проучава се и интеракција платинских комплекса са ДНК у присуству разних хемијских супстанци. Уведен је концепт „заштитних агенаса“, попут једињења која садрже сумпор, као што су натријум-диетилдитикарбамат, глутатион и тиоуреа. Ови агенси привремено раскидају Pt-S (тиоетар) и Pt-S (тиол) везе, смањујући токсичност

платинских комплекса, али не утичу на Pt-1,2-(GpG) везе које су кључне за антитуморско дејство.

Током последњих деценија, интересовање је појачано за реакције платинских једињења са сумпор-везујућим молекулима у интеракцији са нуклеотидима и ДНК. Динуклеарни платински комплекси, као што су Pt-Pt једињења која садрже аминокиселине попут хистидина, глутамина и аспарагина, такође играју важну улогу у проучавању сложених интеракција са ензимима и протеинима који садрже сумпор. Интезивна су и истраживања хетеронуклеарних платинских комплекса, која поседују значајну антитуморску активност (113).

### 1.9.3 Хемиоррадиотерапија

Ефикасност неoadјувантне хемиоррадиотерапије зависи од више фактора, укључујући правилан одабир технике радиотерапијског лечења, оптимално време за извођење ресекције примарног тумора, као и биолошке карактеристике самог тумора. Сви ови елементи заједно утичу на крајњи исход лечења и прогнозу пацијента (156).

С обзиром на то да већина савремених протокола за лечење карцинома колоректума обухвата мултимодални приступ, комбинована хемиоррадиотерапија, било пре или после хируршке интервенције, све више се примењује у терапији локално узнапредовалог колоректалног карцинома (157).

Неoadјувантна хемиоррадиотерапија подразумева зрачење, које може бити протраховано (дужи период) или краткотрајно фракционисано, у комбинацији са хемотерапијом у три циклуса. Након завршетка ових терапијских циклуса, обично се прави пауза од пет до десет недеља, након чега следи хируршка интервенција. Овај приступ омогућава бољу локалну контролу тумора и повећава шансе за успешно хируршко уклањање тумора (156).

На основу анализа добијених МР методом процењује се опасности од развоја рецидива и врши одабир пацијената за овај тип терапије. Те анализе укључују Т статус, N статус, удаљеност малигнитеста од аналног отвора, захваћеност мезоректалне фасције и екстрамуралну инфилтрацију крвних судова. На основу ових критеријума формирају се групе према којима се препоручује модалитет лечења (158).

Предности неoadјувантне хемиоррадиотерапије укључују бољи ефекат лечења пре операције у односу на постоперативно зрачење, јер је локална циркулација крви нетакнута, што побољшава оксигенацију ткива, а тиме и осетљивост туморских ћелија на зрачење. Преоперативна хемиоррадиотерапија такође може смањити величину тумора, побољшати локални статус тумора, повећати стопу потпуне ресекције (Р0) и омогућити очување аналног сфинктера, чиме се повећава учесталост сфинктер-поштедних операција. Овај третман такође може смањити стопу локалног рецидива и јатрогену дисеминацију, јер након хемиоррадиотерапије активне туморске ћелије су значајно смањене, уз појаву фиброзе и некрозе (159,160).

Проценат очуваног сфинктера након преоперативне хемиоррадиотерапије код пацијената са локално узнапредовалим карциномом ректума варира од 56,4% до 85,4%. Што се тиче постоперативних компликација, опсег од 8,4% до 47% указује на значајну варијацију у учесталости компликација (161).

#### **1.9.4 Циљана терапија: биолошка и имунотерапија**

Током последњих деценија, детаљна истраживања молекуларних механизма развоја карцинома, укључујући генетске промене, ћелијске протеине и сигналне путеве, омогућила су увођење нових терапијских приступа у стандардне протоколе лечења колоректалног карцинома. У том контексту, научна заједница посебно истиче концепт комплементарне терапије, који подразумева употребу циљаних терапија за сваки аспект карцинома, као што су ангиогенеза, ћелијска пролиферација и отпорност на апоптозу (162,163).

Циљана терапија спречава развој и пролиферацију малигних ћелија блокирањем сигнала које оне користе за неконтролисан раст и деобу. Првенствено је усмерена на протеине који учествују у ћелијској сигнализацији, чиме се ометају витални процеси неопходни за раст тумора. Један облик циљане терапије усмерен је на рецепторе који се налазе на површини туморских ћелија, док неке врсте ове терапије спречавају ангиогенезу, односно формирање нових крвних судова неопходних за раст тумора. У појединим случајевима, циљана терапија може модификовати гене, што утиче на функцију протеина који регулишу генску активност (164).



## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 2.1 Циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је синтеза хетеронуклеарних комплекса опште формуле  $Pt(II)-L-Zn(II)$ , карактеризација, испитивање интеракција са биомолекулима и испитивање цитотоксичности.

Уз основни циљ, дефинисали смо следеће експерименталне задатке:

1. Структуру добијених комплексних једињења одредити помоћу елементарне микроанализе, инфрацрвене, нуклеарно-магнетно-резонанционе и масене спектроскопије.
2. Испитати стабилност комплекса у физиолошким условима. Одређивање  $pK_a$  вредности диаква аналога хетеронуклеарних комплекса.
3. Испитати интеракцију синтетисаних комплекса са ДНК и ХСА при различитим експерименталним условима.
4. Проучавање интеракције комплекса са ДНК и ХСА помоћу молекулског докинга.
5. Испитати потенцијалну антитуморску активност синтетисаних хетеронуклеарних комплексе опште формуле  $Pt(II)-L-Zn(II)$ .

### 2.2 Радне хипотезе испитивања

1. Структура добијених комплексних једињења биће потврђена помоћу елементарне микроанализе, инфрацрвене, нуклеарно-магнетно-резонанционе и масене спектроскопије
2. Добијени комплекси су стабилни у физиолошким условима.
3. Комплекси који су изграђени почевши од цисплатине показиваће више вредности константи  $K_b$  and  $K_{sv}$  у односу на комплексе са трансплатинским делом.
4. Везе које се остварују између хетеронуклеарних или полазног мононуклеарног комплекса су водоничне или Ван дер Валсове везе.
5. Комплекси ће показивати значајну цитотоксичност и селективност.



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1 Хемикалије

Хемијске супстанце које су коришћене у експерименту биле су врхунског квалитета и набављене од добављача Marck (*Darmstadt, Немачка*) и Sigma-Aldrich (*Geel, Белгија*).

#### 3.2 Инструменти

Елементарне анализе извршене су на Carlo Erba Elementarnom Analyzeru 1106 и на атомском апсорпционом спектрометру novA 400P (*Analytik Jena, Jena, Немачка*). UV/Vis апсорпциони спектри снимљени су на Uvikon XS (*Secomam, Alès, Француска*) и Perkin Elmer UV/Vis Lambda 35 (*PerkinElmer Inc., Shelton, CT, САД*) спектрофотометрима у опсегу таласних дужина од 190 до 1100 nm и променљивим опсегом пропусности од 0,5 до 4 nm. Спектри су снимани у термостатираним кварцим Suprasil киветима са путањом светлости од 1 cm. IR подаци су добијени помоћу инструмента PerkinElmer® Spectrum One FT-IR спектрометра (*Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, САД*).

На спектрометру Varian Gemini-2000 (200 MHz) бележени су  $^1\text{H}$  спектри (*Varian, Inc. Palo Alto, CA, САД*). ESI (електроспреј јонизација) масени спектри су снимљени на LTQ Orbitrap XL (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД*) помоћу директног ињектовања комплексног једињења растореног у ацетонитрилу. Мерења pH вредности су извршена на Jenway 4330 pH метру (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД*) са комбинованом Jenway стакленом електродом која је калибрисана стандардним пуферским растворима pH 4.0, 7.0 и 10.0 (*Merck*). KCl раствор у референтној електроди замењен је са 3 M NaCl електролитом због спречавања таложења  $\text{KClO}_4$  употребе (165-168).

#### 3.3 Синтеза комплекса

Почетни корак за синтезу хетеронуклеарних комплексних једињења је представља синтезу мононуклеарног једињења који служи као полазна компонента за даље синтезе.

##### 3.3.1 Синтеза мононуклеарног комплексног једињења $[\text{ZnCl}_2(\text{terpy}^{\text{tBu}})]$ (C1)

За припремање  $[\text{ZnCl}_2(\text{terpy}^{\text{tBu}})]$  комплексног једињења 0,0954 g (0,238 mmol) 4,4',4-три-*tert*-бутил-2,2':6'2''-терпиридина је одморено и растворено у 15 ml етанола ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ). Раствор се мешао пола сата на магнетној мешалици. За припремање раствора  $\text{ZnCl}_2$  одмерено је 0,0323 g (0,238 mmol) чврсте супстанце и растворено у 10 ml етанола ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ). У раствор  $\text{ZnCl}_2$  у порцијама је додаван раствор лиганда уз константно мешање у интервалу од 20 минута. При додавању првих неколико порција раствора лиганда у раствор  $\text{ZnCl}_2$  нису запажене никакве видљиве промене у раствору. Након тога, при додавању последње порције и при благом загревању, запажено је благо замућење раствора, односно почетак издвајања белог талога, дошло је до стварања комплекса. Раствор комплексног једињења је остављен на магнетној мешалици да се меша наредних два сата. После мешања раствор је упаравао седам дана на собној температури.

### 3.3.2 Припрема *cis*- или *trans*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>)

У водени раствор који се меша *cis*- или *trans*-диамминдихлоридо(II) 0,0279 g (0,093 mmol, 10 ml), додаван је водени раствор AgClO<sub>4</sub> 0,019 g (0,093 mmol, 10 ml) у порцијама, затим је на 40 степени у просторији без светлости, остављен током вечери. Талог AgCl је процеђен помоћу филтера чија величина пора је 10 μm. Добијен је бледо-жути раствор *cis*- или *trans*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>) који је коришћен као почетни раствор за припрему хетеронуклеарних Pt(II)-L-Zn(II) комплекса.

### 3.3.3 Припрема [ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)(H<sub>2</sub>O)]ClO<sub>4</sub>

У водени раствор комплекса [ZnCl<sub>2</sub>(terpy<sup>tBu</sup>)] 0,05 g (0,093 mmol, 10 ml), додат је водени раствор AgClO<sub>4</sub> 0,019 g (0,093 mmol, 10 ml) додаван је у порцијама. Раствор је остављен преко ноћи да се меша у мраку на температури од 40 °C. Талог AgCl је процеђен помоћу филтера са отворима пора од 10 μm. Раствор [ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>) је коришћен као почетни раствор за даљу припрему хетеронуклеарних Pt(II)-L-Zn(II) комплекса

### 3.3.4 Синтеза хетеронуклеарних платина(II)/цинк(II) комплексних једињења (C2-C5)

У водени раствор *cis*- или *trans*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>) 0,0279 g (0,093 mmol, 20 ml) комплекса који се меша додат је мостни лиганд (пиразин односно 4,4'-бипиридил) (0,093 mmol, 20 ml) на собној температури. У току једног сата раствор [ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)(H<sub>2</sub>O)](ClO<sub>4</sub>) комплекса 0,05 g (0,093 mmol, 20 ml) додаван је у малим порцијама. Вредност pH је подешена да буде између 4 и 5 са 0,1 M HClO<sub>4</sub>, и реакциона смеша је остављена да се меша преко ноћи. Добијени обојени раствор је процеђен и остављен по страни да упарава на собној температури. После извесног времена добијен је талог у виду праха који је био бело-жут када је мостни лиганд био пиразин, а светло-жут када је коришћен 4,4'-бипиридил. Пречишћавање оба комплекса извршено је растварањем комплексних једињења у диметилформамид-у (DMF) растварачу и упаравањем растварача на ротационом упаривачу. Добијени талози комплекса испрани су са малим количинама етра и осушени у вакуму.

## 3.4 Карактеризација мононуклеарног и хетеронуклеарних комплексних једињења

Помоћу резултата елементарне микроанализе, <sup>1</sup>H NMR и инфрацрвене спектроскопије, UV-Vis спектрофотометрије и масене спектрометрије потврђени су састав, а као и чистоћа комплексних једињења. За снимање <sup>1</sup>H спектра коришћен је DMSO-*d*<sub>6</sub> растварач. Резултати карактеризације приказани су у наредном поглављу.

## 3.5 Испитивање интеракције синтетисаних комплексних једињења са ДНК

### 3.5.1 Апсорпциона спектроскопска мерења

Интеракције **C1-C5** комплекса са СТ-ДНК су проучавана помоћу Uv-Vis спектрофотометрије у циљу одређивања константе везивања<sup>1</sup> ( $K_b$ ). Мерења су спроведена на собној температури у 0,01 М фосфатном пуферу (PBS) (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, САД*) рН вредности 7,4. Експерименти су извршени при константној концентрацији одговарајућег раствора комплекса (8  $\mu$ M) и варирањем концентрације СТ-ДНК раствора (0–40  $\mu$ M) додатим фиксној концентрацији. Употребом формуле израчуната је ниво унутрашње константе везивања ( $K_b$ ) (1):

$$[\text{CT-DNK}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = [\text{CT-DNK}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f) \quad (1)$$

Вредност константе  $K_b$  се одређује из нагиба праве и одсечка на у оси зависности  $[\text{CT-DNK}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = f([\text{CT-DNK}])$  у којој са  $[\text{CT-DNK}]$  обележавамо концентрацију ДНК док је  $\varepsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$ .  $\varepsilon_f$  је екстинкциони коефицијент некоординованог комплекса, док је  $\varepsilon_b$  екстинкциони коефицијент координованог комплекса (169-173).

### 3.5.2 Флуоресцентна мерења

Интеракције **C1-C5** комплекса и СТ-ДНК испитиване су помоћу флуоресцентне спектроскопије мерењем промене интензитета флуоресценције раствора етидијум-бромида (ЕБ)/СТ-ДНК након додавања инкрементима испитиваних комплекса (0–50  $\mu$ M). Промене интензитета флуоресценције раствора ДНК се испитују у присуству ЕБ као интеркалационог агенса, да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕБ из његовог ДНК-ЕБ комплекса након додавања испитиваних комплекса.

Целокупно испитивање обављено је при рН 7,4 на температури просторије у 0,01 М PBS-у фосфатном пуферу. Пре сваког мерења, раствори се промешани и инкубирани на собној температури 5 минута. Такође мисиони спектри су бележени у распону од 550 до 750 nm са екситацијом при вредностима од 527 nm и на таласној дужини емисије од 612 nm. Ширина прореза за екситацију и емисију (10 nm) и брзина скенирања одржавани су на константној вредности. *Stern-Volmer* константе,  $K_{sv}$ , су одређене помоћу једначине (2).

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

Са  $[Q]$  обележавамо концентрацију комплекса, док  $I_0$  и  $I$  представљају интензитета флуоресценције у присуству и одсуству комплекса,  $K_{sv}$  је *Stern-Volmer* константа која се из нагиба праве зависности  $I_0/I$  од  $[Q]$  (174-177).

### 3.5.3 Испитивање интеракције комплекса са хуманим серум албумином

Интеракције синтетисаних **C1-C5** са хуманим серум албумином (ХСА) испитиване су применом емисионе флуоресцентне спектроскопије. Целокупно испитивање обављено је при рН 7,4 на температури просторије у 0,01 М фосфатном пуферу. Концентрација ХСА одржавана је константном на 2  $\mu$ M, док је концентрација комплекса **C1-C5** повећавана од 0 до 30  $\mu$ M, што је резултовало значајним смањењем емисија на 352 nm.

Пре сваког мерења, систем је био промешан инкубиран на собној температури. Емисиони спектри су забележени у интервалу од 300 до 500 nm, уз коришћење екситације на 295 nm. Ширина прореза за екситацију и емисију (10 nm) и брзина

снимања одржавани су на константној вредности. *Stern–Volmer* константе,  $K_{sv}$  су одређене помоћу једначине (2).

### 3.6 Компјутерске методе

#### 3.6.1 DFT (Density Functional Theory) калкулације

Функција B3LYP је коришћена за оптимизацију геометрије заједно са LANL2DZ базним сетом у свим испитиваним комплексима (178,179). Структуре су визуализоване помоћу програма Discovery Studio Visualizer 3.5.0 (v17.2.0) (*Accelrys Software Inc., San Diego, CA, САД*) (180). Све калкулације извршене су помоћу програма Gaussian 09 (*Gaussian, Inc., Wallingford, CA, САД*, 2009) (181).

#### 3.6.2 Симулације молекулског докинга

Кристална структура В-ДНК (PDB ID: 1BNA) и ХСА (PDB ID: 1HK1) преузета је из Protein Data Bank (PDB) (RCSB PDB: Почетна страница). Симулације молекулског докинга реализоване су уз помоћ софтвера Autodock 4.2, опремљеног графичким корисничким интерфејсом (GUI) Auto-DockTools (ADT 1.5.6rc3) (182). Након тога, поларни водоникови атоми су додати, а ADT је коришћен за уклањање кристалне воде. Гајстигрова наелектрисања су додата сваком атому, а неполярни водоникови атоми су спојени у структуру ДНК. Структуре су затим сачуване у PDBQT формату за даља истраживања у ADT-у. За визуализацију резултата докинга коришћене су бесплатне верзије Discovery Studio Visualizer 3.5.0 (*Accelrys Software Inc.*), PyMOL програма (v1.3r1) и Chimera софтвера (v 1.17.3) (180,183,184).

### 3.7 Методологија *in vitro* експеримента

#### 3.7.1 Ћелијске линије и култивација ћелија

Коришћене ћелијске линије укључују мишији карцином колона СТ26 (изолизован из BALB/С миша, *American Type Culture Collection CRL-8538, TCC, USA*), хумани карцином колона НСТ116 (*American Type Culture Collection ATCC® CCL-247™, USA*), и мезенхималне матичне ћелије из костне сржи C57Bl/6 мишева (S1502-100, *Gibco/Invitrogen*).

Употреба различитих ћелијских линија, укључујући мишији модел колоректалног карцинома СТ26 и хумани НСТ116, показали су се као ефикасан приступ у проучавању карцинома. Коришћење мезенхималних матичних ћелија додатно доприноси разумевању интеракција туморских ћелија и стромалног микроокружења, посебно у контексту регенерације ткива и потенцијалне терапијске примене. Квалитет култивације и висок проценат вијабилности су кључни фактори који омогућавају дуготрајне и успешне експерименте.

Ћелије су претходно сачуване у криосредству на  $-196^{\circ}\text{C}$ , а пре сваког експеримента, одмрзаване су у воденом купатилу на  $37^{\circ}\text{C}$ . Ћелијске линије су одмрзаване кратким излагањем на воденом купатилу, а затим су суспензије ћелија центрифуговане ради



уклањања криосредства. Након тога, ћелије су ресуспендоване у свежем медијуму DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), који је обогаћен неопходним компонентама као што су 10% Fetal Bovine Serum (FBS), L-глутамин, пеницилин и стрептомицин. Ћелије су потом инкубиране на 37°C, у атмосфери од 5% CO<sub>2</sub>, где је медијум мењан сваких 2-3 дана како би се одржавала адекватна средина за раст ћелија.

Када су ћелије достигле 80% конфлуенције, приступало се процесу пасажирања како би се обезбедио континуирани раст ћелија. Пасажирање је спровођено коришћењем 0,25% раствора трипсина, којим су ћелије одлепљене од подлоге. Након одлепљивања, додавањем свежег медијума, активност трипсина је прекинута. Овај процес омогућава да се мањи број ћелија пренесе у нови флак са свежим медијумом.

Вијабилност ћелија је оцењена бојењем са трипан-плавом бојом. Ова метода омогућава идентификацију живих ћелија на основу њихове очуваности, јер виталне ћелије не упијају боју, док мртве постају плаве. Број живих ћелија израчунат је коришћењем хемоцитометра, а вијабилност у свим експериментима била је изнад 95%, што је омогућило поуздане експерименте.

### 3.7 МТТ тест: Процена вијабилности ћелија рака након третмана хетеронуклеарним комплексима

Вијабилност ћелијских линија мишјег колоректалног карцинома (CT26), као и хуманих колоректалних линија (HCT116 и SW480), заједно са неканцерозним мишјим мезенхималним матичним ћелијама (mMSC), испитивана је након третмана новосинтетисаним хетеронуклеарним комплексима Pt(II)-L-Zn(II) у трајању од 48 сати. Ове ћелије су излагане комплексима у различитим концентрацијама, а проценат вијабилних ћелија израчунат је према следећој формули:

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E - B) / (K - B) \times 100$$
 где је  $E$  апсорбанца ћелија третираних комплексом,  $B$  апсорбанца контролних ћелија, а  $K$  апсорбанца нетретираних ћелија.

У наредним експериментима, пажња је била усмерена на биолошку активност комплекса који су показали највиши индекс селективности на основу МТТ теста. Ова метода, која се ослања на редукцију МТТ реагенса до љубичастих формазана у присуству митохондријалне сукцинат дехидрогеназе, омогућава прецизно одређивање вијабилности ћелија.

Вијабилне ћелије производе више формазана, што се може квантификовати спектрофотометриски на таласној дужини од 595 nm. Овај процес је коришћен за анализу ефекта новосинтетисаних супстанци на ћелијске линије, при чему су ћелије биле третиране хетеронуклеарним комплексима Pt(II)-L-Zn(II) током 48 сати у различитим концентрацијама.

Након 48 сати, сваком бунару у микроплочи са 96 бунара је додато по 100 µl МТТ реагенса у концентрацији од 5 mg/ml, а инкубација је трајала још четири сата. Након инкубације, додаван је DMSO, који раствара формазане, а затим је апсорбанца мерена на 595 nm. Резултати су показали јасан однос између вијабилности ћелија и концентрације третираног комплекса, омогућавајући даљу анализу селективног индекса (IC<sub>50</sub>), израчунатог као однос токсичности према малигним и нормалним ћелијама.

За све тестиране комплексне супстанце, вијабилност ћелија је процењена на основу њихове способности да преживе третман, а вредности  $IC_{50}$  су коришћене за одређивање ефикасности третмана. Ова метода је показала да МТТ тест пружа поуздане резултате у квантификацији вијабилности ћелија третираних различитим цитотоксичним агенсима, што омогућава прецизно поређење ефеката различитих третмана.

### 3.7.3 Анализа апоптотске смрти

Цитотоксични потенцијал новосинтетисаних хетеронуклеарних комплекса Pt(II)-L-Zn(II) испитиван је употребом проточне цитометрије на туморским ћелијама СТ26, које ће бити третиране Annexin V и пропидијум-јодидом (PI) према устаљеном протоколу. Ова метода омогућава да се утврде различите фазе апоптозе и некрозе на основу интегритета ћелијске мембране и асиметрије мембранских фосфолипиди.

У раној фази апоптозе долази до транслокације фосфатидил-серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране, што омогућава Annexin V, протеину са високим афинитетом за фосфатидил-серин, да се веже за ћелијску мембрану. У каснијим фазама апоптозе и током некрозе, континуитет ћелијске мембране је нарушен, што омогућава пропидијум-јодиду да уђе у ћелију и веже се за њену ДНК.

Након постизања конfluенције од око 70%, медијум је замењен испитиваним хетеронуклеарним комплексом Pt(II)-L-Zn(II), у концентрацијама које одговарају вредностима  $IC_{50}$  добијеним у претходним експериментима. Контролне ћелије нису биле фармаколошки третиране. По завршетку 24-часовне инкубације, ћелије ће бити испране и обојене Annexin V-FITC и PI бојама у одговарајућим концентрацијама. Узорци су подвргнути анализи коришћењем проточног цитометра (FACS Calibur, BD Biosciences), после 15-минутне инкубације на собној температури и анализирано је 20000 догађаја, а добијени подаци су обрађени софтвером FlowJo.

Захваљујући својој способности да се веже за фосфатидил-серин Annexin V представља ефикасан маркер за откривање апоптозе, што омогућава препознавање ћелија које су у раним стадијумима апоптозе. Позитивно бојење Annexin V указује на рану апоптозу, док позитивно бојење и Annexin V и PI указује на касну апоптозу или некрозу. Ћелије које су негативне на оба бојења сматрају се живим. Након завршетка третмана на ћелијама са различитим концентрацијама хетеронуклеарних комплекса Pt(II)-L-Zn(II), резултати су представљени као процентуална заступљеност ћелија у различитим фазама апоптозе и некрозе.

### 3.7.4 Анализа потенцијалног про-апоптотског ефекта испитиваног комплекса

Проточном цитометријом је испитана експресија проапоптотског протеина Вах, антиапоптотског протеина Bcl-2, као и проценат ћелија које показују присуство активне каспазе-3 на туморским ћелијама линије СТ26. За анализу ће бити коришћена антимишја моноклонска антитела специфична за Вах и Bcl-2 (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA), као и антитела за активну каспазу-3 (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA).

Туморске ћелије СТ26 су инкубиране 24 сата у присуству новосинтетисаног хетеронуклеарног комплекса Pt(II)-L-Zn(II) у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима, док су контролне ћелије инкубиране у чистом медијуму. После



инкубације, ћелије ће бити анализирани проточним цитометром (*FACS Calibur*, <sup>2</sup>*BD Biosciences, San Jose, USA*), а подаци ће бити обрађени коришћењем *FlowJo* софтвера (*Tree Star*).

За калибрацију интензитета флуоресценције, употребљена су изотипска контролна антитела, што нам је омогућило да израчунамо просечан интензитет флуоресценције (MFI) за протеине Bax и Bcl-2. Конкретно, MFI је израчунат као однос флуоресценције протеина од интереса (сирови интензитет канала) и флуоресценције изотипске контроле. Такође, у третираним и нетретираним туморским ћелијама анализом одређена је експресија активне каспазе-3 кроз процента ћелија које емитују флуоресценцију.

Ова анализа нам је омогућила да утврдимо како новосинтетисани хетеронуклеарни комплекси Pt(II)-L-Zn(II) утичу на механизме апоптозе у ћелијама CT26, као и да проценимо утицај ових третмана на регулацију апоптозе путем Bax, Bcl-2 и каспазе-3.

### <sup>2</sup>**3.7.5 Анализа експресије Ki67**

Проточном цитометријом је испитана експресија пролиферативног маркера Ki-67 на туморским ћелијама линије CT26. Експресија овог маркера је мерена на ћелијама третираним инхибиторним концентрацијама IC<sub>50</sub> новосинтетисаног хетеронуклеарног комплекса платине Pt(II)-L-Zn(II), током 24 часа.

Након завршене инкубације, туморске ћелије CT26 су испране у хладном PBS раствору и разблажене у свежем медијуму до густине од 3x10<sup>6</sup> ћелија/ml. Потом су ћелије фиксирани и <sup>2</sup>пермеабелизовани коришћењем комплета за фиксацију и пермеабелизацију (*BD Bioscience*) током 20 минута на 4°C. Након инкубације, ћелије су опране Perm/Wash™ Buffer-ом и центрифугиране на 125G током 10 минута.

Након одливања супернатанта, ћелије CT26 су инкубирани са примарним антителима обележеним <sup>2</sup>флуорохромом (FITC), који су специфични за Ki-67. По завршетку инкубације, ћелије су поново опране Perm/Wash™ Buffer-ом, центрифугиране, а затим ресуспендоване у 250 µl пуфера за бојење. Проточна цитометрија је коришћена за анализу експресије Ki-67, што ће нам омогућити да проценимо пролиферативни капацитет ћелија после третмана различитим концентрацијама хетеронуклеарних комплекса Pt(II)-L-Zn(II).

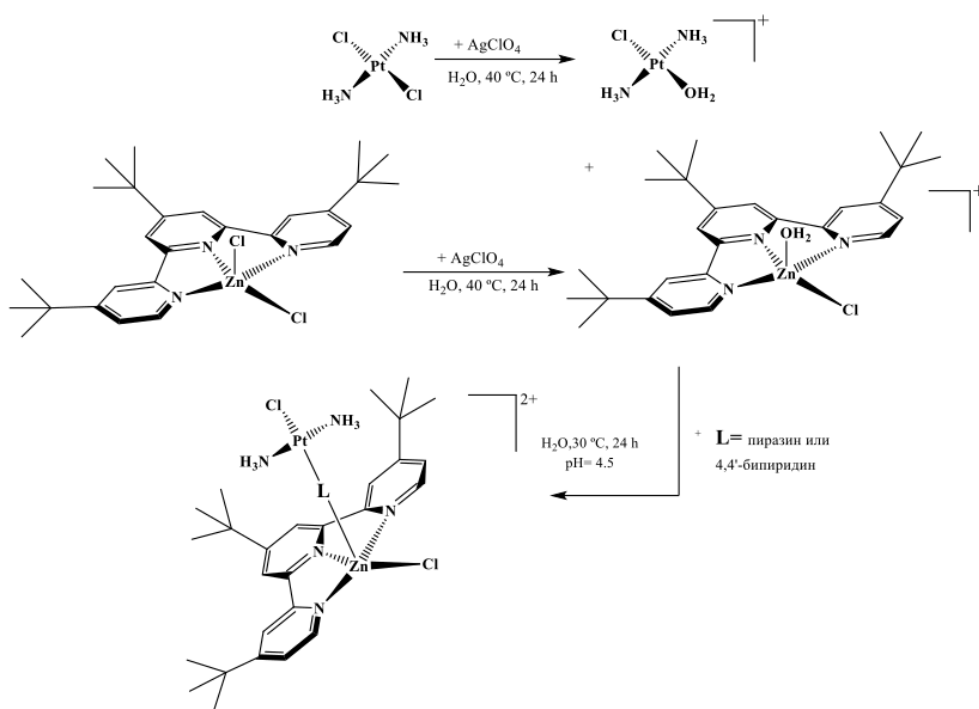
## **3.8 Статистичка обрада података**

Налази истраживања су представљени као средње вредности уз пратећу стандардну девијацију (SD) и стандардну грешку (SE). Статистички значајне разлике између група утврђене су када је *p* била мања од 0,01. За анализу података са неправилном расподелом примењен је непараметарски Mann-Whitney тест, док је за податке са нормалном расподелом употребљен параметарски Студент *t* тест. Испитивање нормалности расподеле вредности обављено је помоћу Kolmogorov-Smirnov теста, пре саме статистичке анализе. За анализу података употребљен је програм SPSS, едисија 22.

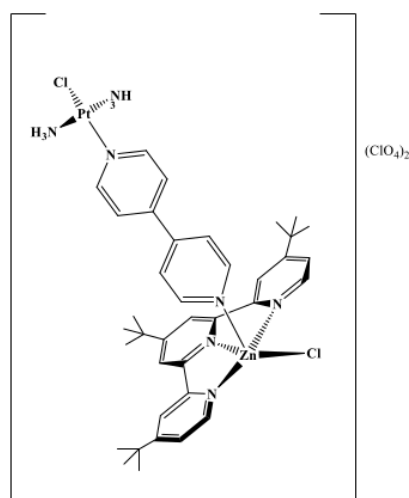
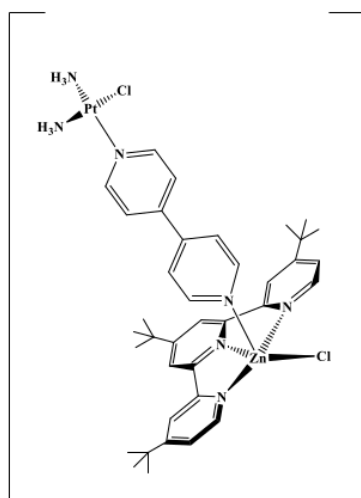
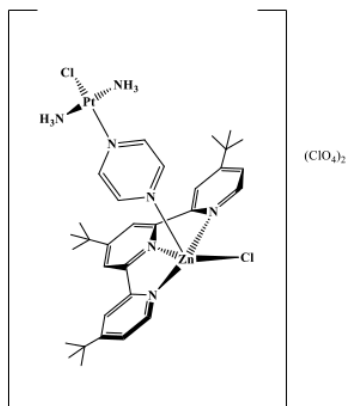
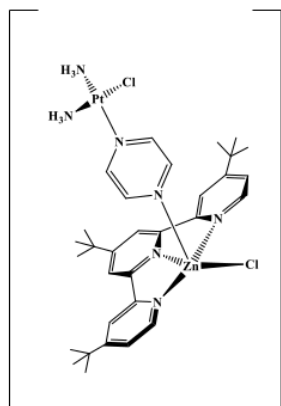
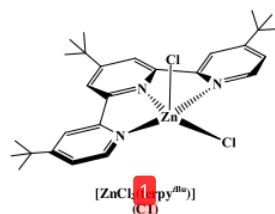
## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Синтеза и карактеризација

4  
Нова комплексна једињења:  $[\text{ZnCl}_2(\text{terpy}^{t\text{Bu}})]$  (**C1**),  $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{t\text{Bu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C2**),  $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{t\text{Bu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C3**),  $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'-бипиридил})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{t\text{Bu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C4**), и  $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'-бипиридил})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{t\text{Bu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C5**) ( $\text{terpy}^{t\text{Bu}} = 4,4',4''\text{-три-}t\text{-бутил-2,2':6',2''}$  терпиридин) су синтетизовани и окарактерисани елементарном анализом, UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и ESI-MS спектрометријом. Општи пут синтезе нових хетеронуклеарних комплекса **C2–C5** приказан је на Схеми 2. За добијање аква честица користи се  $\text{AgClO}_4$ , с обзиром да перхлоратни анјони имају ниску способност везивања за оба јона метала. Структуре новосинтетизованих комплексних једињења су приказане на Слици 8.



**Схема 2.** Схематски приказ синтезе C2–C5 комплекса.



**Слика 8.** Структура испитиваног мононуклеарног комплекса цинка(II) и хетеронуклеарних *cis*- и *trans*-платина(II)–цинк(II) комплекса са усвојеним скраћеницама.

#### 4.1.1 Резултати карактеризације

У циљу потврђивања структуре и степена чистоће **C1–C5** комплексних једињења детаљна карактеризација је урађена и добијени су следећи резултати:

**[ZnCl<sub>2</sub>(terpy<sup>tBu</sup>)] (C1):** принос 0,433 g (81%) израчунато за C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Zn (Mr= 537,88): N 7,81; C 60,29; H 6,56; нађено: N 7,77; C 60,05; H 6,53%. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 295 K): δ 8,77 (s, 2H, терпиридин), 8,68 (t, 2H, терпиридин), 8,45 (s, 2H, терпиридин), 7,55 (t, 2H, терпиридин), 1,56 (s, 27H, *t*Bu) ppm. FT-IR (KBr): 2962 ν(C-H), 1589, 1548, 1477, и 1374 ν(C=C, C=N, ароматични прстен), 1267, 1015 ν(C-N), 865 ν(C=C), 614 ν(Zn-N) cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (H<sub>2</sub>O, λ<sub>max</sub>, nm): 276, 280. ESI-MS: m/z 577,99 ([M + K]<sup>+</sup>) израчунато: 577,13.

**[{cis-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-пиразин)ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)}](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (C2):** принос 0,059 g (60,82%) израчунато за C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>PtZn (Mr= 1046,01): N 9,37; C 35,6; H 4,34; нађено: N 9,33; C 35,46; H 4,33. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C): 9,25–9,22 (m, 2H, терпиридин), δ 8,99–8,95 (m, 4H, pyrazine), 8,92 (m, 2H, терпиридин), 7,33 (s, 2H, терпиридин), 7,08 (s, 1H, терпиридин), 6,84 (s, 1H, терпиридин), 2,86 (s, 3H, NH<sub>3</sub>), 1,48 (s, 27H, *t*Bu) ppm. FT-IR (KBr): 3436 и 3293 ν(N-H, NH<sub>3</sub>), 3116 ν(C-H), 1619, 1435, и 1342 ν(C=C, C=N, ароматични прстен), 1086 ν(C-N), 820 ν(C=C), 626 ν(Zn-N) cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (H<sub>2</sub>O, λ<sub>max</sub>, nm): 274, 284, 306, 316 и 328. Молярни кондуктивитет (Λ<sub>м</sub>, DMF): 131,4 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>, (Λ<sub>м</sub>, ацетонитрил): 251,2 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. ESI-MS: m/z 344,02 ([M – Zn]<sup>+</sup>) израчунато: 344,16; 488,04 ([M – L – Pt]<sup>+</sup>) израчунато: 488,21.

**[{trans-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-пиразин)ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)}](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (C3):** принос 0,064 g (75,1%) израчунато за C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>PtZn (Mr= 1046,01): N 9,37; C 35,60; H 4,34; нађено: N 9,35; C 35,51; H 4,35. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C): 9,05–9,00 (m, 2H, терпиридин), δ 8,95–8,74 (m, 2H, pyrazine), 8,10 (m, 2H, терпиридин), 7,33 (s, 2H, терпиридин), 7,07 (s, 1H, терпиридин), 6,82 (s, 1H, терпиридин), 3,18 (s, 3H, NH<sub>3</sub>), 1,23 (s, 27H, *t*Bu) ppm. FT-IR (KBr): 3436 и 3307 ν(N-H, NH<sub>3</sub>), 2923 ν(C-H), 1617 и 1423 ν(C=C, C=N, ароматични прстен), 1086 ν(C-N), 820 ν(C=C), 623 ν(Zn-N) cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (H<sub>2</sub>O, λ<sub>max</sub>, in nm): 274, 284, 318, и 330. Молярни кондуктивитет (Λ<sub>м</sub>, DMF): 155,9 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>; (Λ<sub>м</sub>, ацетонитрил): 230,1 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. ESI-MS: m/z 344,22 ([M – Zn]<sup>+</sup>) израчунато: 344,16; 488,44 ([M – L – Pt]<sup>+</sup>) израчунато: 488,21.

**[{cis-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-4,4'-bipyridyl)ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)}](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (C4):** принос 0,07 g (66,9%) израчунато за: C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>PtZn (Mr= 1122,11): N 8,74; C 39,60; H 4,40; нађено: N 8,71; C 39,50; H 4,39%. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C): δ 8,98–8,84 (m, 4H, 4-пиридин, 2H терпиридин), 8,36 (m, 2H, терпиридин, 4H, 4-пиридин), 7,99 (s, 2H, терпиридин), 7,95 (s, 1H, терпиридин), 7,85 (s, 1H, терпиридин), 4,75 (s, 3H, NH<sub>3</sub>), 1,23 (s, 27H, *t*Bu) ppm. FT-IR (KBr): 3436 ν(N-H, NH<sub>3</sub>), 2962 ν(C-H), 1607, 1553, 1548, 1477, и 1404 ν(C=C, C=N, ароматични прстен), 1254 и 1015 ν(C-N), 866 ν(C=C), 615 ν(Zn-N) cm<sup>-1</sup>. UV-Vis (H<sub>2</sub>O, λ<sub>max</sub>, in nm): 282. Молярни кондуктивитет (Λ<sub>м</sub>, DMF): 157,2 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>, (Λ<sub>м</sub>, ацетонитрил): 237,2 Ω<sup>-1</sup>cm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. ESI-MS: m/z 1145,70 ([M + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]) израчунато: 1145,20.

**[{cis-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-4,4'-bipyridyl)ZnCl(terpy<sup>tBu</sup>)}](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (C5):** принос 0,06 g (65,5%) израчунато за C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>PtZn (Mr= 1122,11): N 8,74; C 39,60; H 4,40. нађено: N 8,70; C 39,44; H 4,38%. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C): δ 8,99–8,84 (m, 4H, 4-пиридин, 2H терпиридин), 8,35–8,26 (m, 2H, терпиридин, 4H, 4-пиридин), 7,99 (s, 2H, терпиридин), 7,95 (s, 1H, терпиридин), 7,85 (s, 1H, терпиридин), 1,46 (s, 3H, NH<sub>3</sub>), 1,23 (s, 27H, *t*Bu)

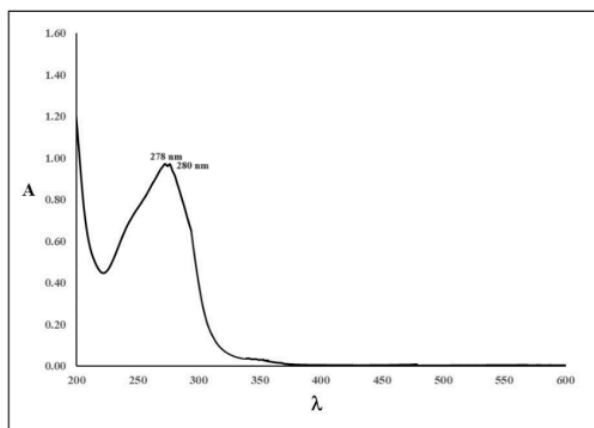
ppm. **FT-IR (KBr):** 3419 и 3309  $\nu(\text{N-H, NH}_3)$ , 2932  $\nu(\text{C-H})$ , 1659, 1551, 1437, и 1391  $\nu(\text{C=C, C=N, ароматични прстен})$ , 1089  $\nu(\text{C-N})$ , 821  $\nu(\text{C=C})$ , 627  $\nu(\text{Zn-N})$   $\text{cm}^{-1}$ . **UV-Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\lambda_{\text{max}}$ , in nm):** 278. **Молярни кондуктивитет ( $\Lambda_{\text{M}}$ , DMF):** 148,0  $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ , ( $\Lambda_{\text{M}}$ , ацетонитрил): 225,3  $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ . **ESI-MS:  $m/z$**  1145,94 ( $[\text{M} + \text{NH}_4^+]$ ) calcd. 1145,20.

#### 4.1.1.1 Спектри C1–C5 комплексних једињења

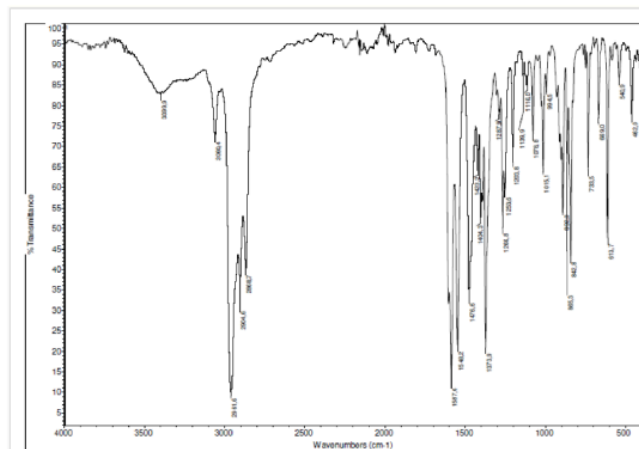
UV-Vis спектофотометријска и кондуктометријска испитивања спроведена су у истраживачким лабораторијама Департмана за природно-математичке науке Државног универзитета у Новом Пазару, док су спектроскопска  $^1\text{H}$  NMR и инфрацрвена мерења урађена на Институту за хемију Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Као растварач за снимање  $^1\text{H}$  спектра коришћен је DMSO- $d_6$ . На Хемијском факултету у Београду извршена су масена спектрометријска мерења. Спектри свих мерења за појединачна комплексна једињења приказана су на Сликама 9-13.

##### [ZnCl<sub>2</sub>(terpy<sup>tBu</sup>)] (C1)

###### UV-Vis спектар

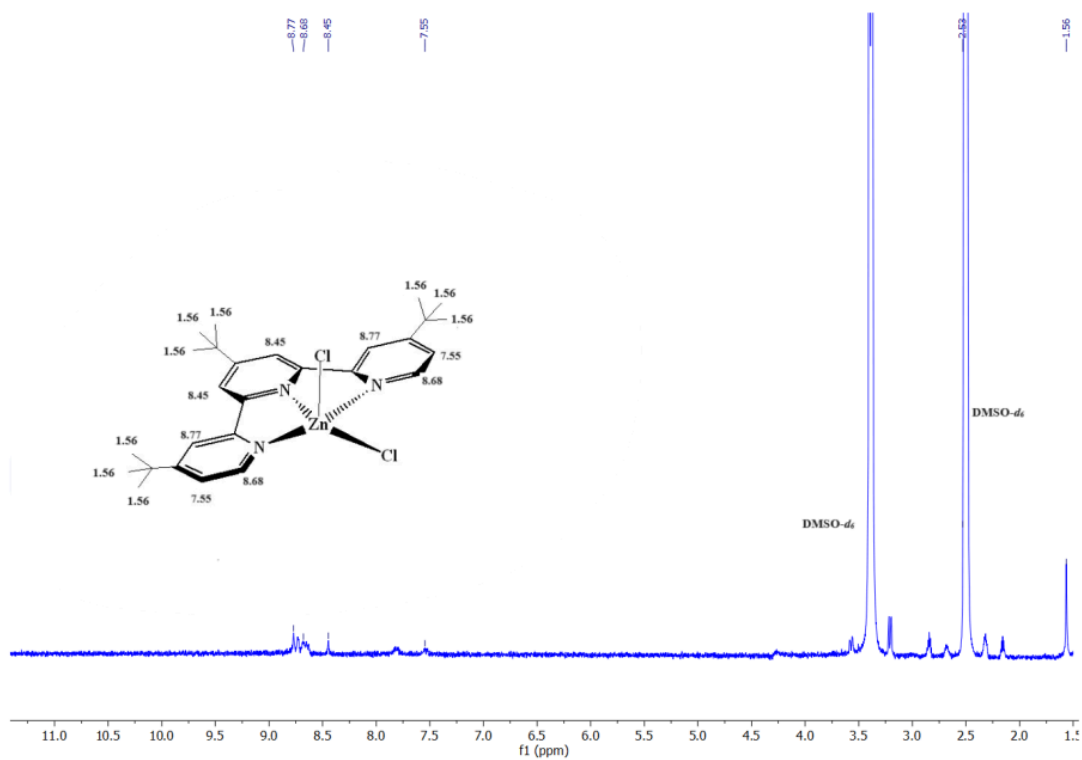


###### FT-IR (KBr) спектар



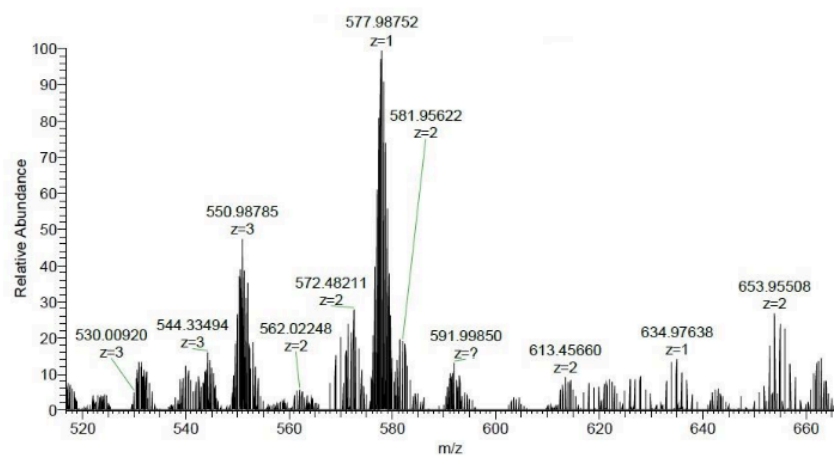


## $^1\text{H}$ NMR спектар



Сигнал на 3,38 ppm се јавља услед присуства воде у  $\text{DMSO-}d_6$

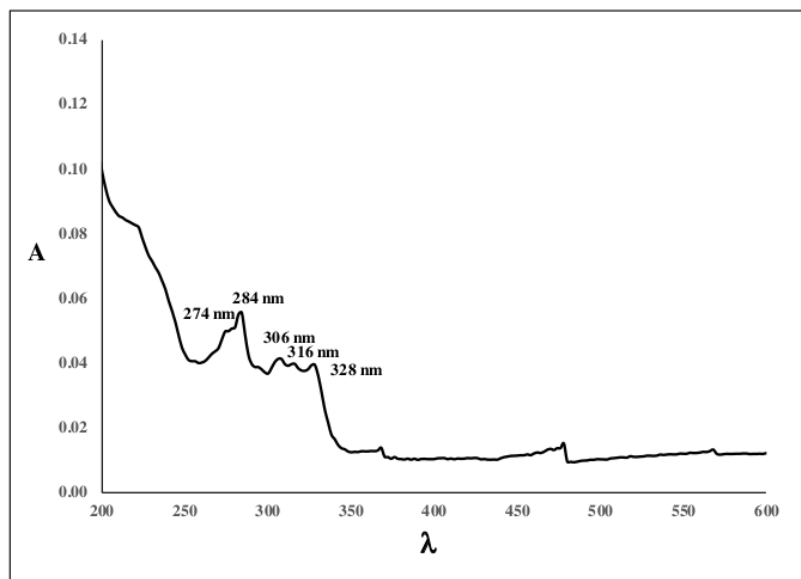
## ESI-MS спектар



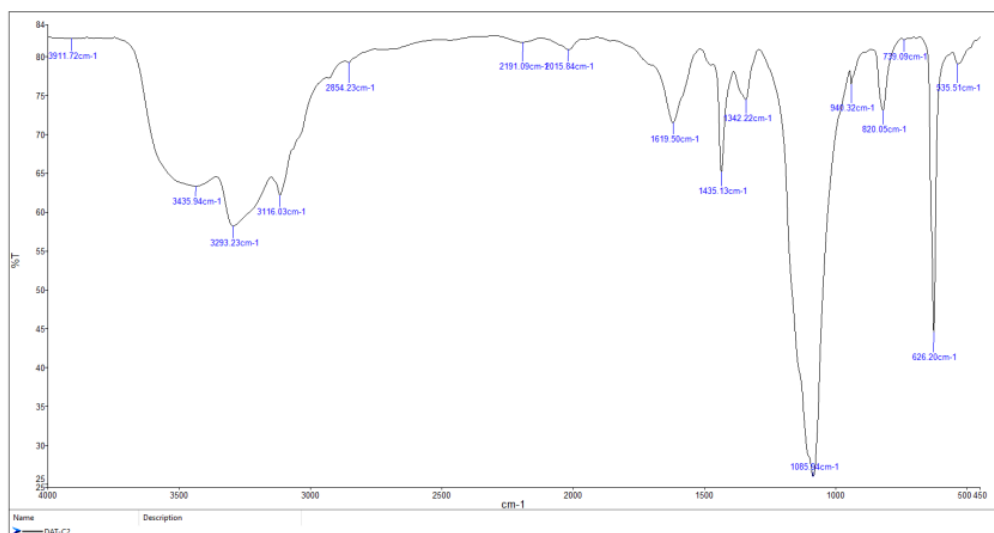
Слика 9. Спектри карактеризације  $[\text{ZnCl}_2(\text{terpy}^{\text{tBu}})]$  комплекса

$[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (C2)

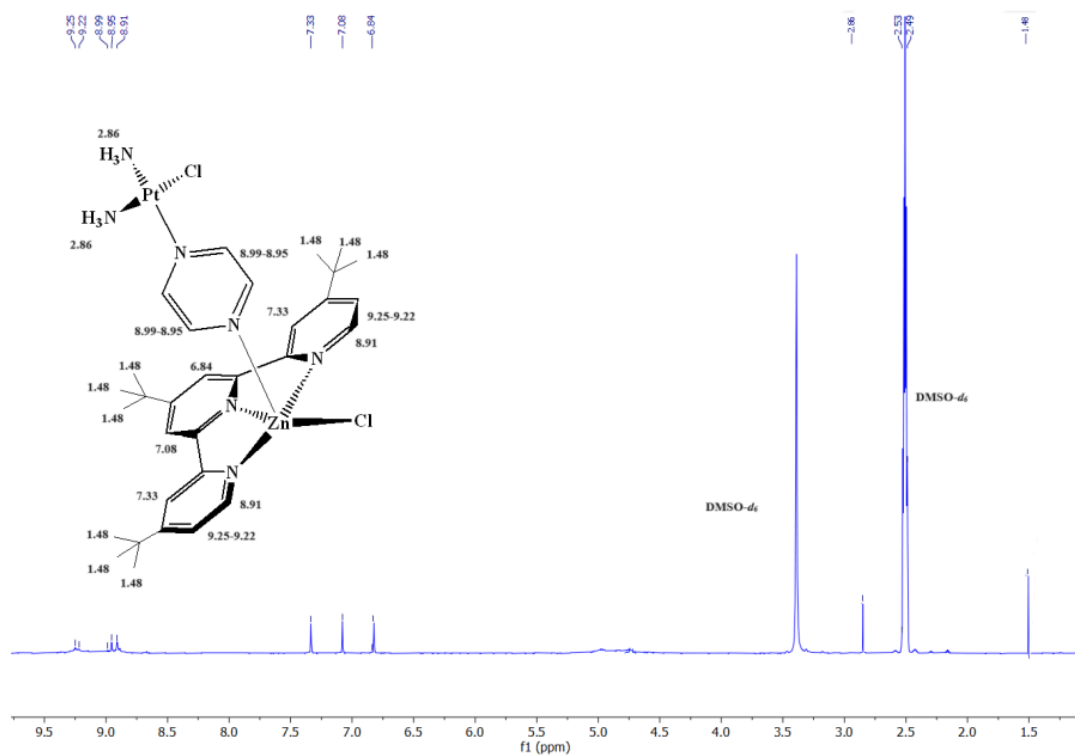
UV-Vis спектар



FT-IR (KBr) спектар



## $^1\text{H}$ NMR спектар

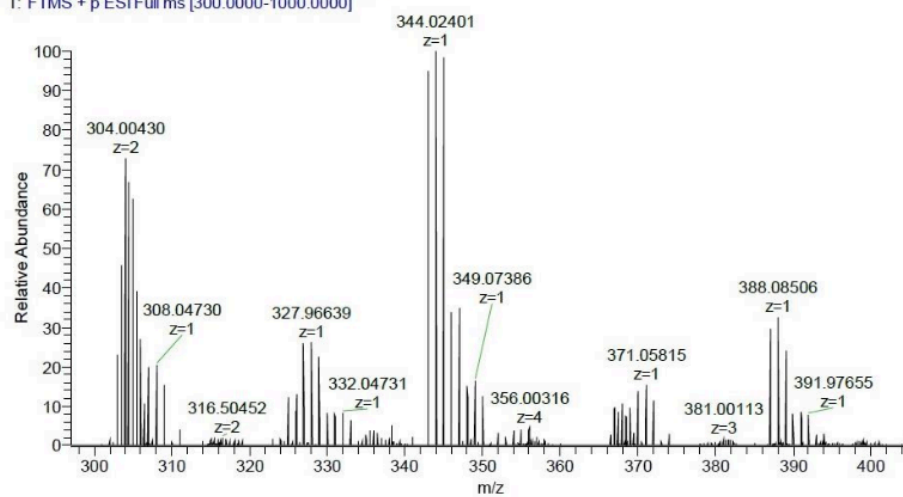


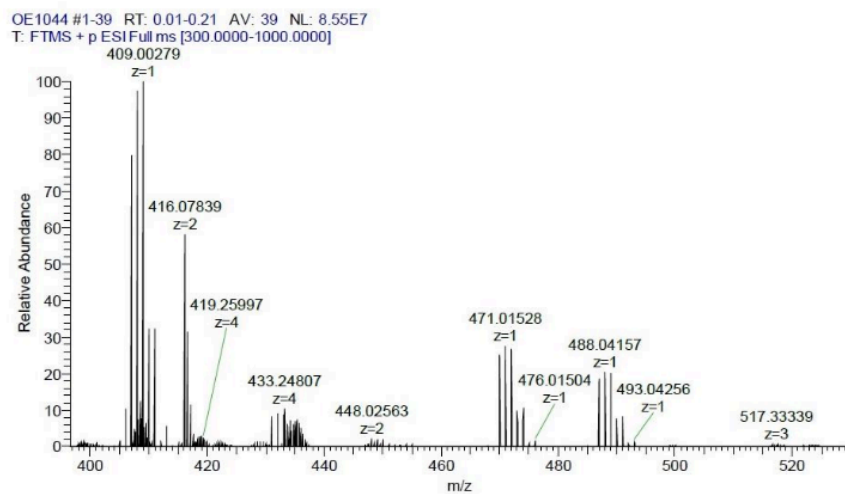
\*Сигнал на 3,38 ppm се јавља услед присуства воде у  $\text{DMSO}-d_6$

## ESI-MS спектар

### Zoomed spectra

OE1044 #1-39 RT: 0.01-0.21 AV: 39 NL: 8.43E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [300.0000-1000.0000]



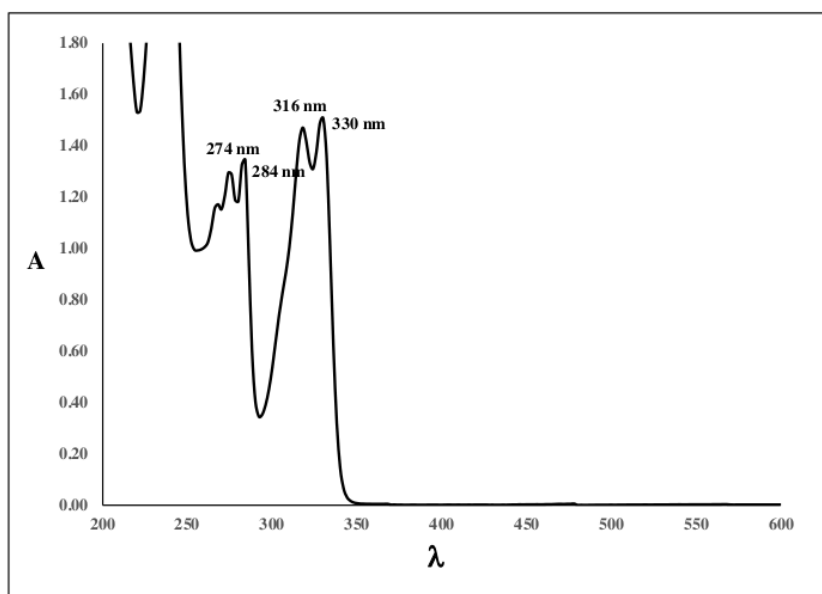


Слика 10. Спектри карактеризације

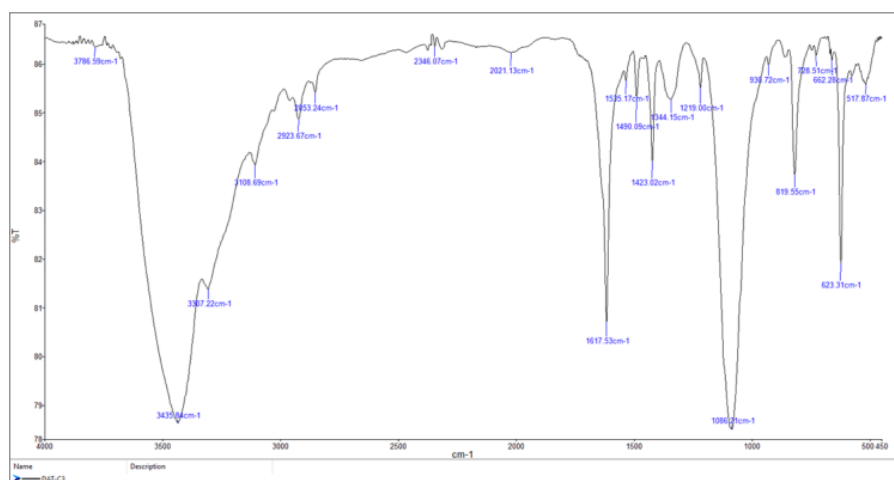
**4**  $[\{cis\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{t\text{Bu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  комплекса

$[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{t\text{Bu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (C3)

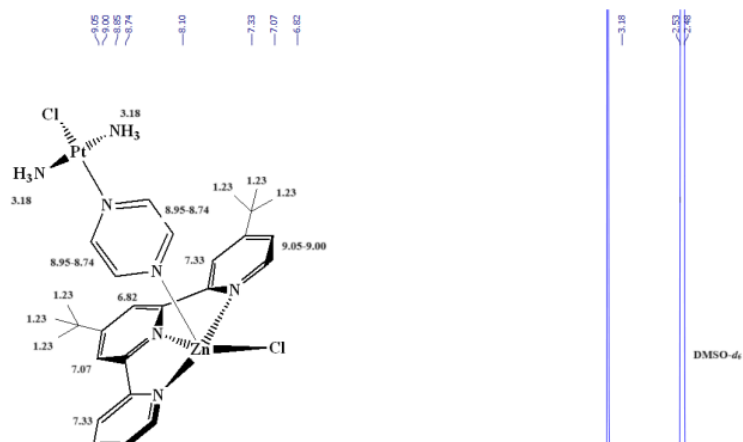
UV-Vis спектар



FT-IR (KBr) спектр



$^1\text{H}$  NMR спектр

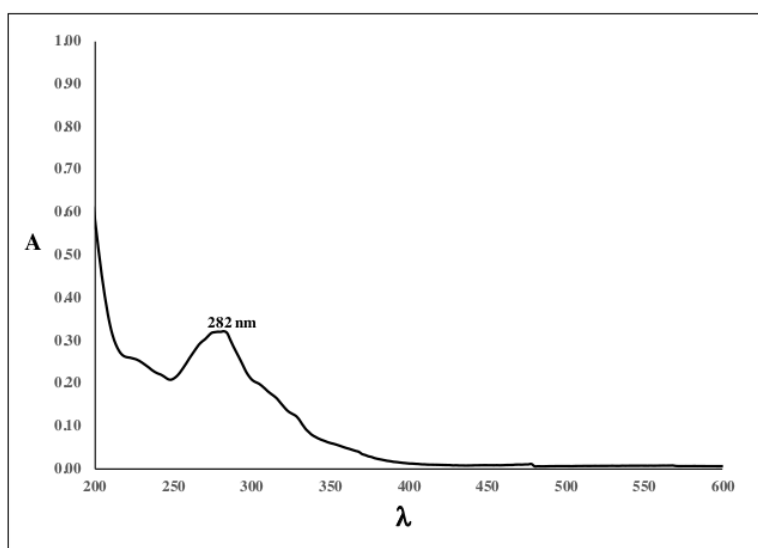


\*Сигнал на 3,38 ppm се јавља услед присуства воде у DMSO- $d_6$

**Слика 11.** Спектри карактеризације  
[*trans*-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-пирозин)ZnCl(terpy<sup>*t*Bu</sup>)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> комплекса

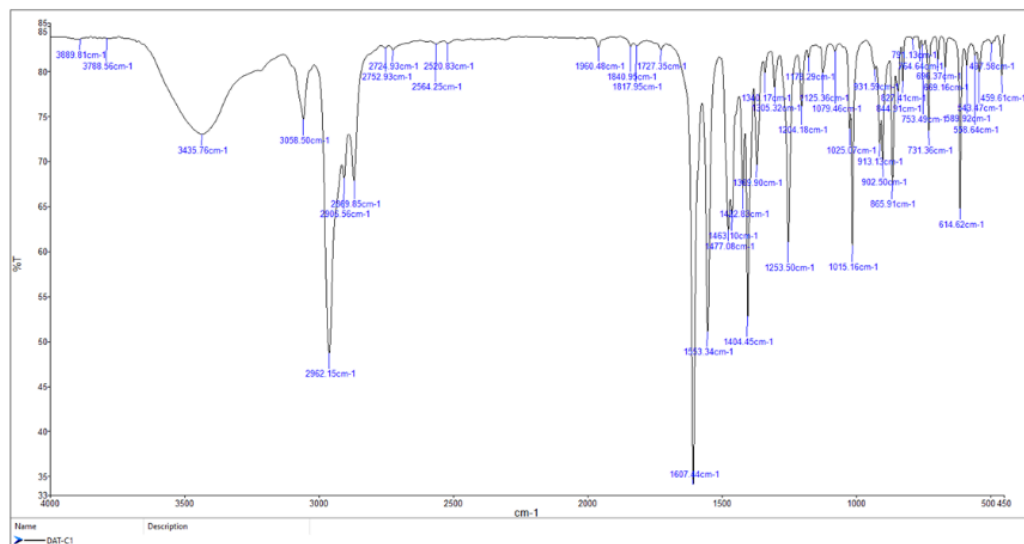


UV-Vis спектар

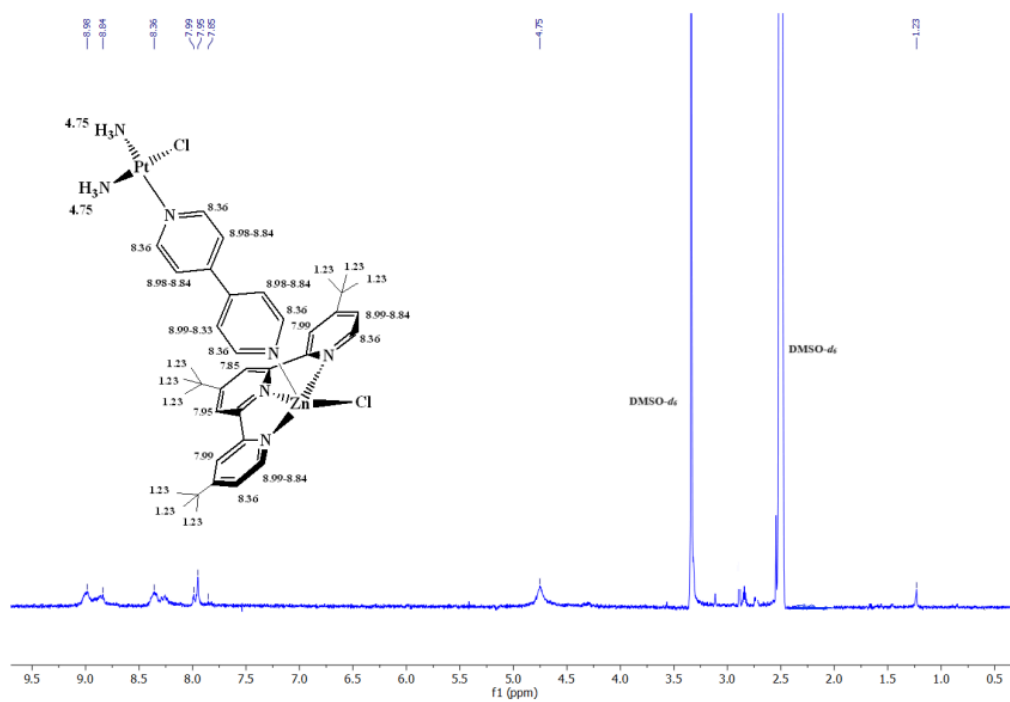


FT-IR (KBr) спектар





### $^1\text{H}$ NMR спектар



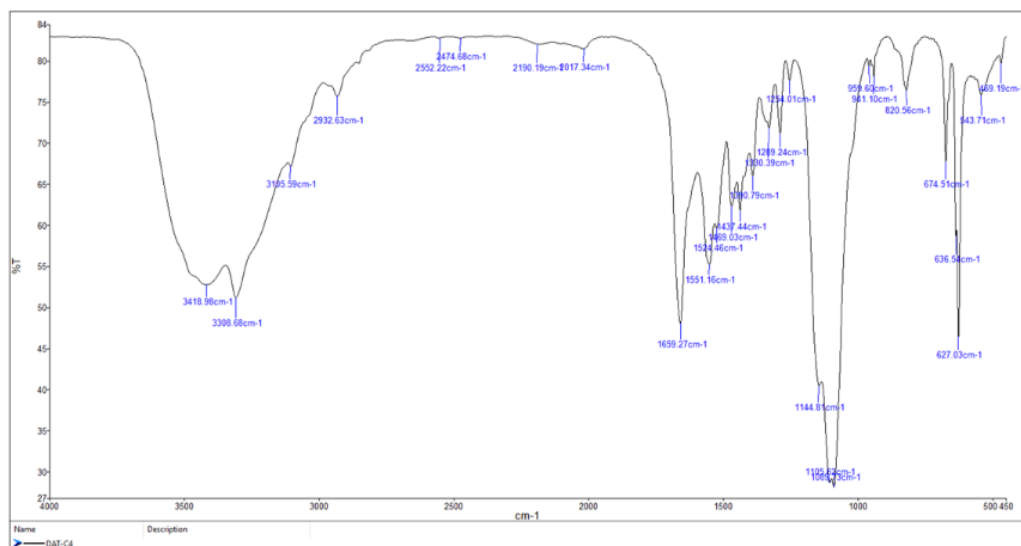
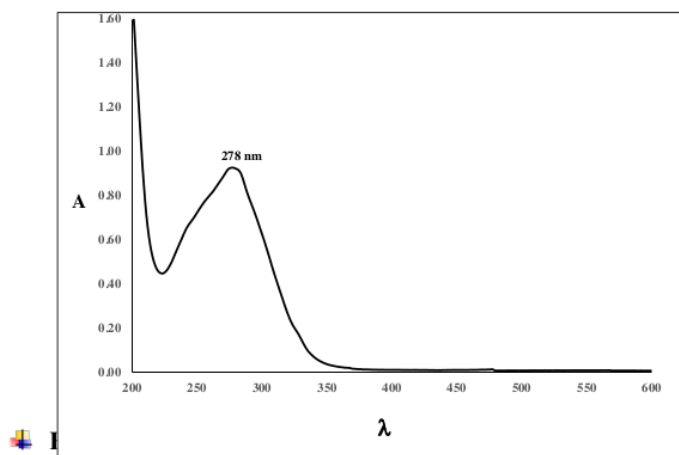
Сигнал на 3,38 ppm се јавља услед присуства воде у  $\text{DMSO-}d_6$

Слика 12. Спектри карактеризације

4  $[\{cis\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'}\text{-бипиридил})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  комплекса

$[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'}\text{-бипиридил})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (C5)

### UV-Vis спектар



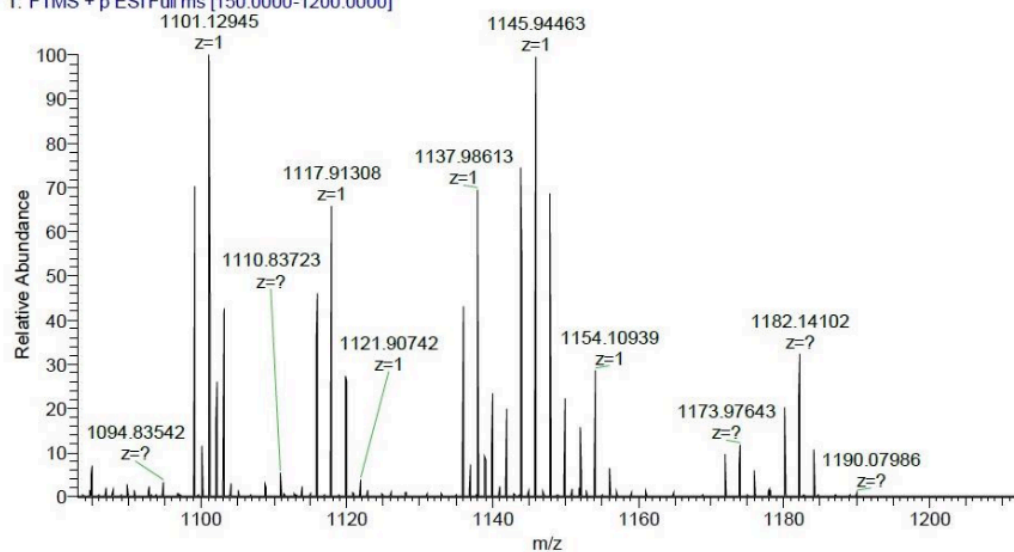
### <sup>1</sup>H NMR спектар



Сигнал на 3.38 ppm се јавља услед присуства воде у DMSO-*d*<sub>6</sub>

ESI-MS спектар

OE1045 #1-114 RT: 0.00-0.20 AV: 114 NL: 1.32E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.0000-1200.0000]



Слика 13. Спектри карактеризације

[{*trans*PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy<sup>*t*Bu</sup>)}](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> комплекса

## 4.2 Испитивање интеракције C1-C5 комплекса са ДНК

ДНК је кључна мета дејства антитуморских лекова. Прецизно познавање везивања лека за ДНК је од суштинског значаја за развој лекова. Интеракције испитиваних комплекса са СТ-ДНК су испитиване употребом UV-Vis и флуоресцентне емисионе спектроскопије, као и помоћу симулационе молекулске докинг методе.

### 4.2.1 Електронска апсорпциона метода

Апсорпциона спектроскопска метода омогућава да се утврди афинитет везивања комплекса са СТ-ДНК молекулом. Да би се испитала ова интеракција, спроведена је титрациона апсорпциона метода у којој је концентрација комплекса била фиксна (8  $\mu\text{M}$ ) а концентрације СТ-ДНК се повећавала до односа 1:5. Са повећањем концентрације СТ-ДНК, интензитет апсорпције се или повећава (хиперхромски помак) или смањује (хипохромски помак), уз благу промену таласне дужине на којој се јавља максимум апсорпције и интезитета апсорпције (169-173). Промене апсорпција у функцији таласних дужина при повећању концентрације СТ-ДНК за испитиване **C1-C5** комплексе су приказани на слици 20 у делу Дискусија.

Резултати указују на хиперхромски ефекат и батохромно померање (*red shift*). Ради упоређивања афинитета везивања комплекса за СТ- ДНК, израчунавају се унутрашње константе везивања ( $K_b$ ). Вредности за константе  $K_b$  израчунате на основу једначине 1 која је дата у одељку Материјал и методе и могу се наћи у Табели 1.

**Табела 1.** Константе везивања,  $K_b$ , и Stern-Volmer константе,  $K_{sv}$ , за интеракције испитиваних комплекса са СТ-ДНК и ХСА.

|              | СТ-ДНК                     |                               | ХСА                           |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|              | $10^4 K_b [\text{M}^{-1}]$ | $10^4 K_{sv} [\text{M}^{-1}]$ | $10^4 K_{sv} [\text{M}^{-1}]$ |
| трансплатина | 2,26 *                     |                               |                               |
| цисплатина   | 5,51 *                     |                               | 0,24 **                       |
| C1           | $2,5 \pm 0,1$              | $2,2 \pm 0,1$                 | $1,8 \pm 0,1$                 |
| C2           | $6,6 \pm 0,1$              | $2,9 \pm 0,1$                 | $5,8 \pm 0,1$                 |
| C3           | $2,0 \pm 0,1$              | $2,1 \pm 0,1$                 | $4,5 \pm 0,1$                 |
| C4           | $11,1 \pm 0,1$             | $5,2 \pm 0,1$                 | $22,7 \pm 0,1$                |
| C5           | $7,5 \pm 0,1$              | $2,9 \pm 0,1$                 | $9,5 \pm 0,1$                 |

\* реф. (185) , \*\* реф.(186)

### 4.2.2 Флуоресцентна мерења

Флуоресцентна спектроскопија омогућава одређивање интеркалационог потенцијала испитиваних комплексних једињења. Интеркалација укључује везивање планарних ароматичних молекула између парова база на ДНК ланцима, што доводи до њиховог продужења. Ови молекули могу променити структуру ДНК, утичући на њену стабилност и функционалност. Етидијум-бромид (ЕБ) се често користи као интеркалациони агенс за ДНК и емитује снажну флуоресценцију на 612 nm када се интеркалира између два ланца ДНК (174). Међутим, додавање једињења која могу

интеркалирати између ланаца ДНК и сузбити ефекте ЕБ-а доведше до смањења флуоресцентне емисије (175-177).

Уколико је комплексно једињење способно да замени ЕБ, доћи ће до смањења флуоресценције, што указује на способност комплекса да се везује интеркалацијом. Да би се утврдило да ли **C1–C5** комплекси могу да избаце ЕБ из СТ–ДНК/ЕБ комплекса, испитиване су интеракције комплекса са СТ–ДНК у присуству ЕБ. СТ–ДНК/ЕБ раствор формиран је комбиновањем ЕБ и СТ–ДНК раствора концентрације од 5  $\mu\text{M}$  на рН 7.4. Интеракције комплекса са СТ–ДНК испитиване су методом емисионе флуоресцентне спектроскопије, мерењем промене интензитета флуоресценције раствора СТ–ДНК–ЕБ након додавања испитиваних комплекса (Слика 20, Дискусија). *Stern–Volmer* константе,  $K_{sv}$ , су одређене на основу једначине 2 која је приказана у одељку Материјал и методе и могу се наћи у Табели 1.

### 4.3 Испитивање интеракције C1–C5 комплекса са хуманим серум албумином

Албумин је најзаступљенији протеин у крвотоку и игра кључну улогу у транспорту виталних лекова до њихових циљаних места. Испитивање интеракција испитиваних комплекса са хуманим серум албумином пружа боље разумевање механизма деловања антиканцерских лекова и наглашава важност проучавања интеракција између хуманог серум албумина и различитих једињења у циљу развоја ефикаснијих терапија канцера.

Услед присуства триптофанских аминокиселинских остатака ХСА емитује флуоресценцију на 295 нм. Ова карактеристика чини флуоресцентну спектроскопију ефикасном методом за проучавање интеракција комплекса са ХСА. Уколико испитивани комплекс интерагује са ХСА, повећање концентрације комплекса ће довести до смањења флуоресценције, као што је приказано на слици 21 у делу Дискусија. Смањење флуоресценције указује на промене у терцијарној структури протеина, што сугерише везивање испитиваног комплекса за молекул ХСА (187-190). Једначина 2 је коришћена за одређивање *Stern–Volmer* константи,  $K_{sv}$ , које се одређују из линеарне зависности  $I_0/I$  у функцији од  $[Q]$  (Табела 1).

## 4.4 Резултати симулације молекулског докинга

### 4.4.1 Интеракција са ДНК

Метода молекулског докинга коришћена је за предвиђање начина везивања комплекса за ДНК. Добијени резултати су приказани су у Табели 3. За комплекс **C1**, вредност за  $\Delta G$  је  $-6,21 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  док вредност за инхибиторну  $K_i$  константу износи 28,18  $\mu\text{M}$ . Вредности за **C2–C5** комплексе су негативније (**C2** =  $\Delta G = -9,76 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; **C3** =  $\Delta G = -10,01 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; **C4** =  $\Delta G = -10,80 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; и **C5** =  $\Delta G = -11,22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), док су вредности одговарајућих инхибиторних константи следеће: (**C2** =  $K_i = 28,12 \mu\text{M}$ ; **C3** =  $K_i = 70,24 \mu\text{M}$ ; **C4** =  $K_i = 12,10 \mu\text{M}$ ; и **C5** = 5,93  $\mu\text{M}$ ).

**Табела 2.** Преглед добијених резултата молекулског докинга за тренутно испитиване комплексе (**C1–C5**) и претходно тестиране комплексе (**C1a–C4a** и **C1b–C2b** (415,416) са ДНК ( $\Delta G$  је енергија везивања,  $K_i$  је константа инхибиције).

| ознака | комплекс                                                                                                                                   | $\Delta G^a$ | $K_i$               |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|
| C1     | <sup>4</sup><br>[ZnCl <sub>2</sub> (terpy <sup>tBu</sup> )]                                                                                | -6,21        | 28,18 <sup>b</sup>  |
| C2     | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>          | -9,76        | 70,24 <sup>c</sup>  |
| C3     | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>        | -10,01       | 45,85 <sup>c</sup>  |
| C4     | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>   | -10,80       | 12,10 <sup>c</sup>  |
| C5     | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | -11,22       | 5,93 <sup>c</sup>   |
| C1a *  | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy-Cl)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                       | -4,92        | 248,49 <sup>b</sup> |
| C2a *  | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy-Cl)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                     | -4,96        | 230,84 <sup>b</sup> |
| C3a *  | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy-Cl)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                | -5,84        | 52,15 <sup>b</sup>  |
| C4a *  | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy-Cl)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>              | -5,36        | 117,06 <sup>b</sup> |
| C1b *  | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                          | -6,47        | 18,05 <sup>b</sup>  |
| C2b *  | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                        | -6,53        | 16,30 <sup>b</sup>  |
| C3b *  | <sup>1</sup><br>[ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>    | -8,18        | 1,01 <sup>b</sup>   |
| C4b *  | [ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy)}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                  | -8,07        | 1,22 <sup>b</sup>   |

<sup>a</sup> kcal·mol<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>  $\mu$ M; <sup>c</sup> nM. \* реф. (191,192)

#### 4.4.2 Интеракција са ХСА

Метода молекулског докинга је такође коришћена за утврђивање повољног места везивања и афинитета комплекса C1–C5 према ХСА. Ради тачности, коришћен је метод валидације са тироксином (THYR) молекулом (који је оригинално комплексан у 1HK1 серумском албумину, описаном у другим радовима (190). У Табели 3 су приказани најбољи резултати доковања за тестиране комплексе у поређењу са THYR-ом.

**Табела 3.** Преглед резултата молекулског докинга испитивања интеракција између C1–C5 комплекса са ХСА.

| ознака | комплекс                                                                                                                                   | $\Delta G^a$ /место везивања |             |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|
|        |                                                                                                                                            | I (subII)                    | II (subIII) |
| THYR   | Thyroxine <sup>b</sup>                                                                                                                     | -43,57                       | -30,05      |
| C1     | <sup>1</sup><br>[ZnCl <sub>2</sub> (terpy <sup>tBu</sup> )]                                                                                | -37,02                       | -25,06      |
| C2     | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>          | -43,30                       | -38,36      |
| C3     | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -пиразин)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>        | -43,05                       | -33,93      |
| C4     | [{ <i>cis</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>   | -29,95                       | -28,82      |
| C5     | [{ <i>trans</i> -PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( $\mu$ -4,4'-бипиридил)ZnCl(terpy <sup>tBu</sup> )}](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | -29,58                       | -29,79      |

<sup>a</sup> kJ·mol<sup>-1</sup>; <sup>b</sup> реф.(190).

## 4.5 Резултати процене антитуморске активности

### 4.5.1 МТТ тест: Процена цитотоксичности у *in vitro* условима хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II)

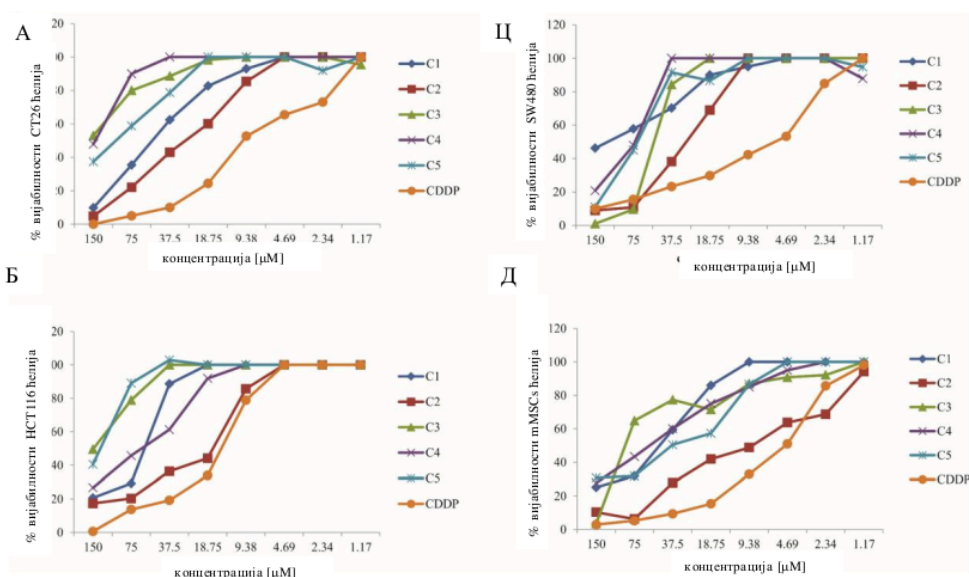
Цитотоксичност новосинтетисаних моно- и хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II), који садрже 4,4',4''-три-*tert*-бутил-2,2':6',2''-терпиридин лиганд (означени као **C1–C5**), процењена је коришћењем МТТ теста. Ова процена је извршена на различитим ћелијским линијама: мишији колоректални карцином (СТ26), људски колоректални карцином (HCT116 и SW480) и нормалне мишије мезенхималне матичне ћелије (mMSC). Ове ћелијске линије су биле изложене синтетисаним комплексима 48 сати, са концентрацијама у распону од 1,17 до 150  $\mu\text{M}$ . Резултати су показали да моно- и хетеронуклеарни комплекси платине(II) и цинка(II) са наведеним лигандом (**C1–C5**) испољавају значајне цитотоксичне ефекте на људске (HCT116 и SW480) и мишије (СТ26) ћелије колоректалног карцинома (Слика 14). Поред тога, комплекси **C1–C5** су показали дозно-зависну цитотоксичну активност против ћелија колоректалног карцинома, док су исказали релативно ниску цитотоксичност према нормалним mMSC ћелијама (Слика 14Д).

У контексту развоја лекова са ниском токсичношћу, неопходно је проценити антипролиферативну активност против нормалних ћелија. *In vitro* токсичност тестираних комплекса према нормалним мишијим мезенхималним матичним ћелијама (mMSC) је испитана. Утврђено је да сви комплекси смањују вијабилност нормалних ћелија (mMSC) на дозно-зависан начин (Слика 14Д).

Значајно је то да је комплекс **C1** показао мањи цитотоксични ефекат на mMSC у концентрацијама од 1,17 до 18,75  $\mu\text{M}$  у поређењу са његовим ефектом на ћелије рака (HCT116, SW480 и СТ26). Ова смањена цитотоксичност комплекса **C1** према mMSC, заједно са значајним утицајем на вијабилност туморских ћелија (HCT116, SW480 и СТ26), сугерише потенцијалну селективну цитотоксичност овог новог комплекса према канцерогеним ћелијским линијама. Ови налази указују на могућност побољшане *in vivo* толеранције за овај комплекс.

У истраживању цитотоксичне ефикасности комплекса **C1–C5**, извршена је детаљна квантитативна процена вредности половине максималне инхибиторне концентрације ( $\text{IC}_{50}$ ). Ова процена је била усмерена на мишије ћелијске линије колоректалног карцинома СТ26 и људске ћелијске линије колоректалног карцинома HCT116 и SW480. Добијене  $\text{IC}_{50}$  вредности, које указују на концентрацију потребну да сваки комплекс инхибира 50% вијабилности ћелија, детаљно су наведене у Табели 4.





**Слика 14.** Дозно-зависни цитотоксични ефекти комплекса **C1–C5**. Ова слика илуструје дозно-зависну цитотоксичност комплекса **C1–C5** на различитим ћелијским линијама, одређену помоћу МТТ теста након 48 сати излагања. Графици приказују стопе преживљавања следећих ћелијских линија при третману комплексима **C1–C5** и цисплатином (CDDP): (А) ћелије мишијег колоректалног карцинома (CT26), (Б) ћелије људског колоректалног карцинома (HCT116), (Ц) ћелије људског колоректалног карцинома (SW480), (Д) мезенхималне матичне ћелије миша (mMSC). Приказани подаци су средње вредности добијене из три одвојена експеримента, сваки спроведен у три примерка.

Анализом ових  $IC_{50}$  вредности, уочено је да комплекс **C1** показује интензивније цитотоксичне ефекте против мишијих CT26 и људских HCT116 ћелија у поређењу са другим комплексима у серији. Супротно томе, цисплатина (CDDP), стандардни хемиотерапијски агенс, показала је снажније цитотоксичне ефекте према овим туморским ћелијама у поређењу са комплексима **C1–C5**. Међутим, вреди напоменути да је цисплатина такође показала повећану цитотоксичност према мишијим мезенхималним матичним ћелијама, као што је детаљно приказано у Табели 4.

**Табела 4.** Вредности  $IC_{50}$  комплекса **C1–C5** и цисплатина (CDDP) на ћелијским линијама CT26, HCT116 и SW480 одређене МТТ тестом.

| Комплекси | $IC_{50} \pm SEM (\mu M)$ |                     |                     |                   |
|-----------|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
|           | CT26                      | HCT 116             | SW480               | mMSCs             |
| <b>C1</b> | 44,7 $\pm$ 58,73          | 88,23 $\pm$ 48,52   | 106,26 $\pm$ 126,08 | 56,72 $\pm$ 6,93  |
| <b>C2</b> | 35,07 $\pm$ 39,65         | 26,57 $\pm$ 25,87   | 25,71 $\pm$ 2,93    | 10,1 $\pm$ 0,98   |
| <b>C3</b> | 210,25 $\pm$ 86,98        | 181,35 $\pm$ 104,51 | 68,14 $\pm$ 5,21    | 76,24 $\pm$ 11,95 |

|             |                |                |               |                |
|-------------|----------------|----------------|---------------|----------------|
| <b>C4</b>   | 183,16 ± 72,37 | 89,43 ± 6,7    | 94,06 ± 9,89  | 60,34 ± 2 4,66 |
| <b>C5</b>   | 107,58 ± 79,89 | 151,95 ± 26,82 | 75,44 ± 21,18 | 40,17 ± 3,96   |
| <b>CDDP</b> | 9,03 ± 3,55    | 14,7 ± 2,21    | 10,1 ± 3,98   | 7,32 ± 2,51    |

Поред тога, терапијска селективност ових комплекса је оцењена израчунавањем индекса селективности, који је приказан у Табели 6. Овај индекс је важан показатељ за одређивање релативне цитотоксичности једињења на ћелије рака у односу на неканцерогене ћелије. Израчунава се као однос IC<sub>50</sub> вредности у мишијим мезенхималним матичним ћелијама у односу на вредност у туморским ћелијама.

Виши индекс селективности указује на већу специфичност и смањену токсичност према нормалним ћелијама, што је кључни фактор у терапији рака. Значајан резултат ове студије био је изразито висок индекс селективности за комплекс **C1**. Ово сугерише да комплекс **C1** показује знатно већи цитотоксични ефекат на тестиране линије канцерогених ћелија (CT26, HCT116 и SW480) у односу на неканцерогене mMSC ћелије. Ова наглашена селективност истиче потенцијал комплекса **C1** као кандидата за циљану терапију рака, што имплицира смањен ризик од оштећења здравих ћелија. На основу ових запажања, комплекс **C1** је изабран за даља детаљна испитивања.

**Табела 5.** Индекс селективности (SI) комплекса **C1–C5** и цисплатине на ћелијским линијама CT26, HCT116 и SW480

| Комплекси   | Индекс селективности (IC <sub>50</sub> mMSC/IC <sub>50</sub> ) |         |       |
|-------------|----------------------------------------------------------------|---------|-------|
|             | CT26                                                           | HCT 116 | SW480 |
| <b>C1</b>   | 1,3                                                            | 0,6     | 0,5   |
| <b>C2</b>   | 0,3                                                            | 0,4     | 0,4   |
| <b>C3</b>   | 0,4                                                            | 0,4     | 1,1   |
| <b>C4</b>   | 0,3                                                            | 0,7     | 0,6   |
| <b>C5</b>   | 0,4                                                            | 0,3     | 0,5   |
| <b>CDDP</b> | 0,8                                                            | 0,5     | 0,7   |

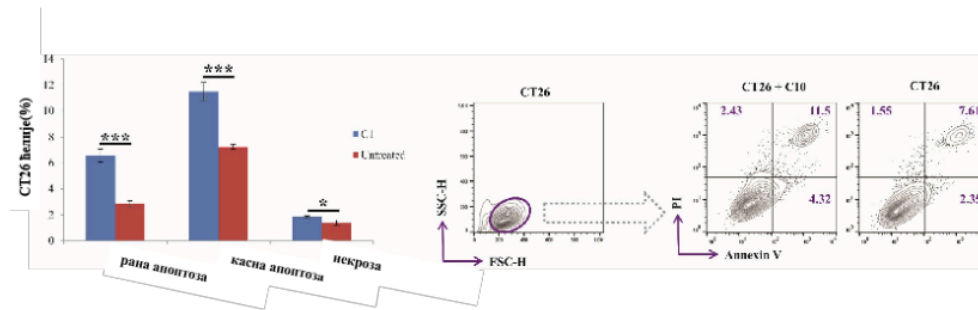
#### 4.5.2 Процена апоптотске смрти ћелија изазване **C1** комплексом

Апоптоза, често названа програмираном смрћу ћелија, је високо регулисан процес који се дешава на контролисан начин унутар појединачних ћелија, осигуравајући да нема оштећења суседних ћелија. Ова прецизност чини индукцију апоптозе виталном стратегијом у лечењу карцинома, јер циљано и систематски елиминише ћелије рака, а истовремено очува здраво ткиво. Индукција апоптозе омета ненормалну пролиферацију која је карактеристична за ћелије рака, чиме се инхибира раст и прогресија тумора. Ефикасност овог метода лежи у његовој способности да селективно циља ћелије рака, смањујући вероватноћу појаве нежељених ефеката који су уобичајени код других терапија рака (193).

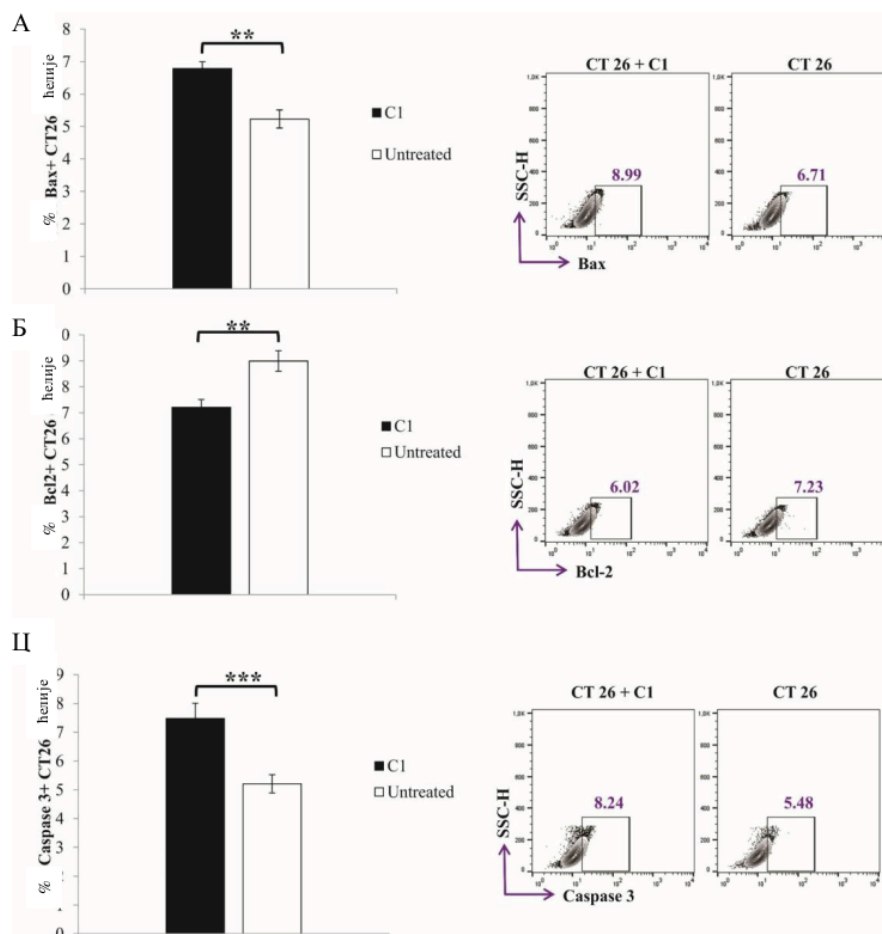
Способност комплекса **C1** да изазове апоптотску смрт у туморским ћелијама процењена је коришћењем анализе проточном цитометријом. Ова анализа је укључивала третирање ћелија комплексом **C1**, након чега су ћелије бојене Annexin V

FITC и пропидијум јодидом. Резултати, приказани на Слици 15, показали су да је значајан део CT26 ћелија, након 24 сата третмана комплексом C1, ушао и у ране и у касне фазе апоптозе.

Штавише, значајно запажање било је да је значајан проценат CT26 ћелија такође прошао кроз некрозу у поређењу са нетретираним ћелијама, што је приказано на истој Слици 15. Ови налази истичу двоструко деловање комплекса C1 у промовисању смрти ћелија кроз апоптотске и некротичне путеве, сугеришући његов потенцијал као моћног анти-карциномског агенса.



**Слика 15.** Индукција апоптозе у ћелијама колоректалног карцинома комплексом C1. Ова слика приказује апоптотске ефекте комплекса C1 на ћелије колоректалног карцинома CT26. Процена апоптозе је спроведена проточном цитометријом, користећи двоструко бојење Annexin V (FITC) и Пропидијум јодидом (PI) како би се разликовала различита стања ћелија. Репрезентативни FACS графици категоришу ћелије у следеће популације: виталне ћелије (AnnV–PI–), рано апоптотске ћелије (AnnV+PI–), касно апоптотске ћелије (AnnV+PI+), некротичне ћелије (AnnV–PI+). Подаци су изражени као средње вредности  $\pm$  SEM (стандардна грешка средње вредности) из три независна експеримента. Статистичка значајност је означена са  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ , истичући разлике између третираних ћелија комплексом C1 и нетретираних ћелија CT26.



**Слика 16.** Утицај комплекса **C1** на експресију протеина повезаних са апоптозом у туморским ћелијама. Ова слика приказује ефекат комплекса **C1** на експресију кључних протеина повезаних са апоптозом у туморским ћелијама. Ниво експресије Вах и Bcl-2 протеина у CT26 ћелијама, које су нетретиране и третиране комплексом **C1** током 24 сата, оцењен је проточном цитометријом. Репрезентативни FACS графици у панелима (A) и (Б) илуструју разлике у експресији Вах и Bcl-2 протеина, респективно. Додатно, утицај комплекса **C1** на експресију каспазе-3 у CT26 ћелијама колоректалног карцинома приказан је у панелу (Ц). Ова експресија је такође оцењена проточном цитометријом, са FACS графицима који показују проценат експресије каспазе-3 у нетретираним и **C1**-третираним CT26 ћелијама. Сви подаци су изражени као средње вредности  $\pm$  SEM из три независна експеримента. Статистичка значајност је назначена са  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$ , указујући на разлике између ћелија третираних комплексом **C1** и нетретиране контролне групе.

Апоптоза као критичан облик програмиране смрти ћелија, игра кључну улогу у одржавању ћелијске хомеостазе и неопходна је за развој и здравље вишћелијских организама. Апоптоза се углавном активира преко два пута: екстринзични пут апоптозе, који укључује рецепторе за смрт и доводи до активације каспазе-3, и интринзични или митохондријални пут апоптозе (194).

Овај други се покреће дисбалансом између проапоптотских и антиапоптотских протеина, као што су Вах и Bcl-2. Овај дисбаланс мења пропустљивост митохондријалне мембране, што доводи до ослобађања цитохрома c из митохондрија и касније активације каспазе-3, што води до апоптозе (195).

Вах проапоптотски члан породице Bcl-2 протеина, промовише смрт ћелија олакшавајући ослобађање цитохрома c из митохондрија (196). Супротно томе, Bcl-2 делује као антиапоптотски протеин, инхибирајући деловање проапоптотских агенаса и тиме спречавајући апоптозу (197). Каспаза-3, кључна извршна каспаза у путу апоптозе, активира се у апоптотским ћелијама путем оба пута екстринзичног (лиганд за смрт) и интринзичног (митохондријални) и одговорна је за цепање различитих кључних ћелијских протеина, што доводи до морфолошких и биохемијских промена које карактеришу апоптозу (199).

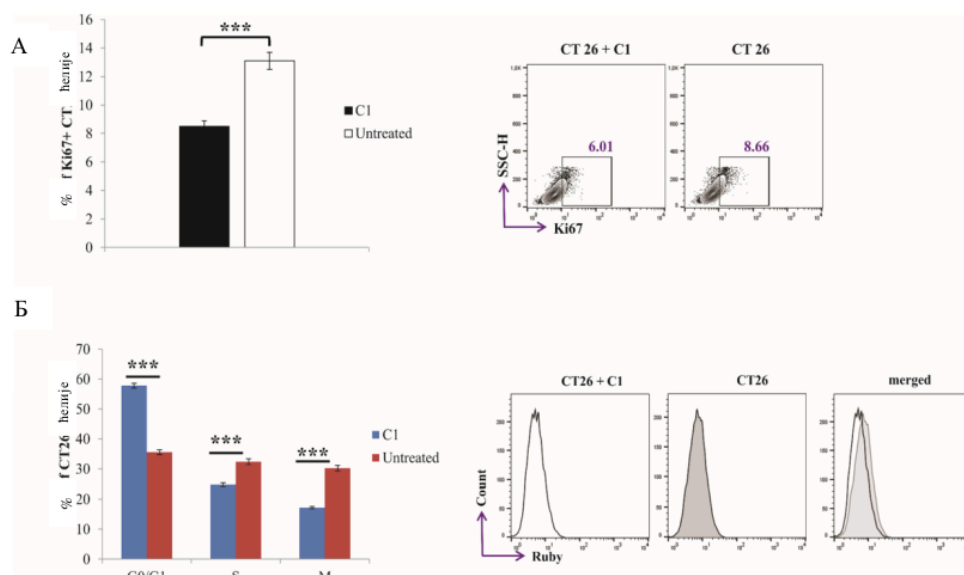
Резултати наше студије указују да третман ћелија са концентрацијама комплекса C1 на нивоу IC<sub>50</sub> повећава проценат Вах-позитивних CT26 ћелија, док смањује проценат Bcl-2-позитивних CT26 ћелија (Слика 16A, B). Поред тога, уочено је да комплекс C1 повећава пропорцију каспаза-3-позитивних CT26 ћелија (Слика 16C). Уочено повећање експресије каспазе-3, уз смањење експресије Bcl-2, сугерише могуће механизме деловања комплекса C1 кроз индукцију апоптозе. Даље, значајан пораст Вах молекула, проапоптотског агенаса, након третмана комплексом C1 наглашава његову улогу у промовисању апоптозе у CT26 ћелијама.

#### **4.5.3 Ефекти комплекса C1 на ћелијски циклус и пролиферацију у ћелијама карцинома CT26**

Протеин Ki67, добро познат као маркер пролиферације, има функцију везивања за ДНК и углавном се експримије у активно пролиферишућим ћелијама, али не и у ћелијама које су у стању мировања. Овај протеин се сматра поузданим показатељем ћелијске пролиферације јер је присутан током свих активних фаза ћелијског циклуса (фазе G1, S, G2 и M), док је одсутан у фази мировања (G0) (199).

Протеин Ki67 често се користи у клиничким и истраживачким установама за процену степена раста ћелијске популације, пружајући увид у брзину пролиферације ћелија. Ниво његове експресије директно је повезан са пролиферацијом ћелија, што га чини вредним алатом за процену пролиферативног статуса ћелија рака и ефикасности антиканцерских терапија (200). У оквиру истраживања антипролиферативних ефеката комплекса C1, извршена је детекција нивоа експресије Ki67 у третираним ћелијама CT26. Студија је показала значајно нижу експресију молекула Ki67 у CT26 ћелијама након третмана комплексом C1 у поређењу са нетретираним контролним ћелијама, као што је илустровано на Слици 17A. Ово смањење експресије Ki67 указује на изражено смањење пролиферације ћелија.





**Слика 17. (А) Модулација експресије Ki67 и дистрибуција ћелијског циклуса у CT26 ћелијама под утицајем комплекса C1.** Ова слика приказује ефекат комплекса C1 на експресију протеина Ki67 и дистрибуцију ћелијског циклуса у CT26 туморским ћелијама. Панел (А) приказује репрезентативне FACS графике који илуструју нивое експресије Ki67 у CT26 ћелијама након 24 часовног излагања комплексу C1. Панел (Б) се фокусира на утицај комплекса C1 на дистрибуцију ћелијског циклуса у нетретираним и третираним мишијим ћелијама колоректалног карцинома CT26. Ови ефекти су квантитативно оцењени помоћу проточне цитометрије и приказани су као средња вредност  $\pm$  SEM из три независна експеримента. Статистичка значајност је означена са  $p < 0,001$ , што истиче разлике између ћелија третираних комплексом C1 и нетретираних контролних ћелија.

Истраживање заустављања ћелијског циклуса у CT26 карциномским ћелијама третираним снажним једињењем C1 спроведено је ради расветљавања потенцијалних ћелијских механизма који су у основи његовог антиканцерогеног дејства. У ту сврху, CT26 ћелије су подвргнуте третману комплексом C1 у трајању од 24 сата. Наши резултати показују да новосинтетисани комплекс C1 ефикасно изазива заустављање у фази G0/G1 у CT26 колоректалним карциномским ћелијама (Слика 17В).

Ово заустављање вероватно је последица молекуларних промена унутар ћелија карцинома након третмана. Поред заустављања у фази G0/G1, примећено је значајно смањење у фази синтезе (S фаза) након третмана једињењем C1 (Слика 17В).

Ово смањење у S фази, у којој се дешава репликација ДНК, додатно указује на ефикасност комплекса C1 у ометању напредовања ћелијског циклуса. Овај прекид напредовања ћелијског циклуса сугерише да комплекс C1 нарушава нормалан процес деобе ћелија, што је кључни механизам за пролиферацију ћелија карцинома. Индукција заустављања ћелијског циклуса од стране једињења C1 потенцијално ограничава раст и

ширење карциномских ћелија, истичући његову ефикасност као обећавајућег антиканцерогеног агенса.

Циклини играју кључну улогу у регулацији ћелијског циклуса. Они су породица протеина који контролишу напредовање ћелија кроз ћелијски циклус активирањем циклин-зависних киназа (CDKs). Активност циклина варира током различитих фаза ћелијског циклуса, а њихова регулисана експресија осигурава правилно напредовање и тајминг циклуса (201). Међу разним типовима циклина, циклин D и циклин E су посебно важни током прелаза из G1 фазе у S фазу (202).

Циклин D се удружује са CDK4 и CDK6, играјући кључну улогу у прелазу из G1 фазе у S фазу ћелијског циклуса промовишући ћелијско окружење неопходно за репликацију ДНК. Често се сматра сензором екстрацелуларних митогених сигнала и кључним фактором у одлуци ћелије да се дели (203).

С друге стране, циклин E се удружује са CDK2 и игра значајну улогу у припреми за синтезу ДНК, помажући да се ћелија усмери у S фазу. Регулисана експресија циклина D и E је од суштинског значаја за одржавање нормалног напредовања ћелијског циклуса, а њихова дисрегулација често се примећује у различитим типовима карцинома (204).

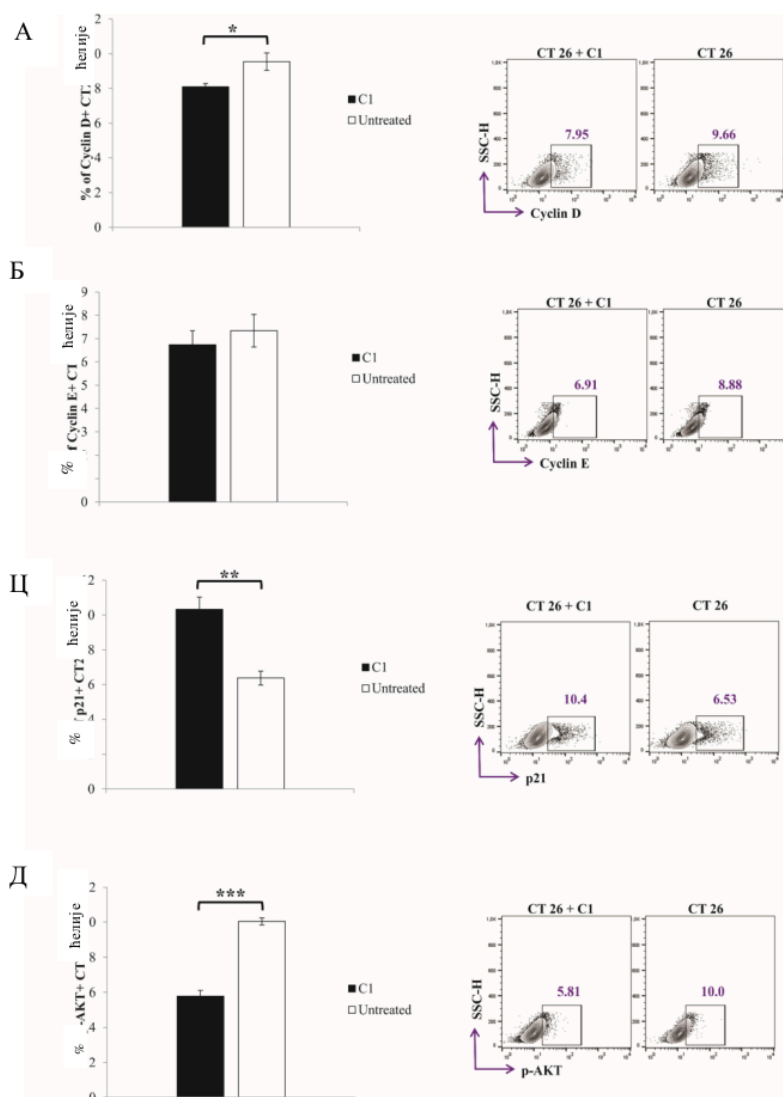
Да би се проценио утицај комплекса C1 на циклин D и циклин E, CT26 ћелије су третиране IC<sub>50</sub> концентрацијом једињења C1 у трајању од 24 сата. Резултати, приказани на Слици 18A, показују да комплекс C1 значајно смањује проценат ћелија позитивних на циклин D, што указује на смањење популације ћелија које прелазе из G1 у S фазу. Међутим, експресија ћелија позитивних на циклин E није била значајно измењена третманом (Слика 18B).

Ова селективна редукција циклина D сугерише да комплекс C1 специфично омета напредовање ћелијског циклуса у G1 фази, потенцијално доводећи до заустављања ћелијског циклуса и инхибиције даље пролиферације CT26 ћелија. У сличном контексту, установљено је да рутенијум(II)–платина(II) бис(терпиридил) антиканцерогени комплекси такође мењају активност циклина D и E. Ови комплекси су показали да блокирају улазак ћелија у S фазу (205).

Постоји критична интеракција између циклина D, p21 и фосфорилисаног АКТ (p-AKT) у регулацији ћелијског циклуса. p21, инхибитор циклин-зависне киназе (CDK), игра кључну улогу у контроли ћелијског циклуса инхибирањем активности CDK–циклин комплекса, укључујући оне који укључују циклин D. p21 може бити индукован као одговор на различите стимулусе, укључујући оштећење ДНК и друге сигнале стреса, делујући као регулатор који зауставља напредовање ћелијског циклуса, посебно на G1 контролној тачки. Ова инхибиција је кључни аспект ћелијског одговора на оштећење, спречавајући репликацију оштећене ДНК (206).

С друге стране, p-AKT, фосфорилисани облик протеин киназе B (AKT), је значајан онкогени играч који учествује у контроли пролиферације и преживљавања ћелија. Фосфорилација АКТ доводи до активације низводних путева који промовишу раст и преживљавање ћелија, што га чини критичном метом у терапији карцинома. Дисрегулација АКТ сигнализације често се примећује у разним карциномима, доприносећи туморогенези и развоју резистенције на терапију (206).





**Слика 18.** Експресија протеина ћелијског циклуса и сигналних протеина у CT26 ћелијама третираним комплексом C1. Ова слика приказује репрезентативне FACS графике који детаљно приказују експресију кључних протеина ћелијског циклуса и сигналних протеина у CT26 ћелијама након 24 часовног излагања комплексу C1. Панел (А) илуструје експресију Циклина D. Панел (Б) приказује нивое Циклина E. Панел (Ц) се фокусира на експресију протеина p21. Панел (Д) приказује нивое фосфорилисаног АКТ (p-AKT) у овим ћелијама. Подаци добијени проточном цитометријом су представљени као средња вредност  $\pm$  SEM, изведени из три независна експеримента. Статистичка значајност је означена са  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , и  $p < 0.001$ , што истиче значајне разлике у експресији ових протеина између ћелија третираних комплексом C1 и нетретираних контролних ћелија.

Након третмана комплексом **C1**, CT26 ћелије су показале промене у експресији ових кључних регулатора ћелијског циклуса. Примећено је повећање процента ћелија које експримирају p21, инхибитор CDK (Слика 18Ц). Ова урегулација p21 вероватно доприноси супресији активности CDK, чиме се додатно појачава заустављање ћелијског циклуса. Поред тога, третман комплексом **C1** је изазвао значајно смањење нивоа фосфорилисаног АКТ-а (p-АКТ) (Слика 18Д). Смањење p-АКТ, кључног елемента у онкогеним сигналним путевима који олакшавају преживљавање и пролиферацију ћелија, указује на потенцијални антитуморски ефекат комплекса **C1**. Ове промене у експресији p21 и p-АКТ указују на способност комплекса **C1** да наруши критичне процесе у регулацији ћелијског циклуса и сигнализацији преживљавања, чиме показује свој потенцијал као ефикасан антиканцерогени агенс.

Укупно, може се закључити да супституенти на тридентатним терпиридинским лигандима, као што су *tert*-бутил групе, значајно утичу на антипролиферативни ефекат и начин везивања ДНК код мононуклеарних и хетеронуклеарних платинум(II)/цинк(II) комплекса. Стерна хиндранса изазвана додавањем крупних *tert*-бутил група на терпиридину повећава величину хетеронуклеарних комплекса, смањујући њихову флексибилност и реактивност. Ово би могао бити главни разлог зашто мононуклеарни комплекс **C1**, у поређењу са хетеронуклеарним **C2–C5**, показује највиши селективни индекс, чиме постаје обећавајући циљани антиканцерогени агенс.

## 5. ДИСКУСИЈА

Дизајн нових хетеронуклеарних комплекса као потенцијалних антиканцерогених агенаса постао је нови тренд за побољшање антиканцерогених својстава појединачних металолекова (207,208). Иако лекови на бази платине показују изузетну антитуморску активност, њихова ефикасност је ограничена нежељеним ефектима као што су резистенција и токсичност, манифестованим у виду нефротоксичности, неуротоксичности, ототоксичности, кардиотоксичности и других (209-212). Укључивање два различита јона метална, од којих је један биолошки активан, у исту једињење може побољшати антитуморску активност. Ово побољшање може настати услед селективних интеракција јона метална са биомолекулима или побољшања хемијско-физичких својстава насталих хетеронуклеарних комплекса (синергизам) (213). Механизам деловања лекова на бази платине је веома добро познат, а антитуморска активност се објашњава интеракцијама између платина(II) комплекса и ДНК, углавном преко N7 атома гуанина, док се негативни нежељени ефекти објашњавају интеракцијама са биомолекулима који садрже сумпор (209-211). Цинк(II) јон, као гранична Левисова киселина, има афинитет према атомима који донорске атоме азот или кисеоник у биомолекулима (215-219). Недавне студије указују да су хетеронуклеарни комплекси са општом формулом *cis*- или *trans*-Pt-L-Zn реактивнији према конститuentима ДНК него према биомолекулима који садрже сумпор. Ови комплекси су показали значајно већу цитотоксичност у поређењу са цисплатином (415,440). Повећана цитотоксичност може се приписати потенцијалном утицају на више интрацелуларних процеса и структура у које је укључен цинк(II) јон. Молекуларни механизми који регулишу одговор ћелијске линије карцинома дебелог црева HCT116 на цитотоксично дејство ових комплекса су сложени, укључујући интеракције између различитих сигналних путева (191-192,216). Ново дизајнирани хетеронуклеарни злато(I)/платина(II) комплекси са бипиридиламин-фосфин лигандима показали су изражене антипролиферативне ефекте, у распону сличном или вишем од цисплатина (217). Тест цитотоксичности показује да рутенијум(II)/ренијум(I) такође показује већу антиканцерогену активност од цисплатине. Комплекси изазивају апоптозу кроз регулацију ћелијског циклуса, деполаризацију потенцијала митохондријалне мембране, повећање интрацелуларних реактивних врста кисеоника и каспазну каскаду (218).

Нови платина(IV)/рутенијум(II) комплекси, који комбинују цитотоксична својства цисплатина са антимајстатским карактеристикама рутенијум-арен комплекса, показали су већу цитотоксичност у поређењу са цисплатином. Они су показали ниску микроларну, суб-микроларну и наномоларну цитотоксичност у већини испитиваних ћелија људског карцинома. Поред тога, ови хетеронуклеарни комплекси су се показали ефикасним чак и у ћелијама отпорним на цисплатину, конкретно A2780cisR (карцином јајника) и A549cisR (аденокарцином плућа) (219,220). Дизајн и развој хетерометалних комплекса као лекова против рака укључује мултидисциплинарни приступ, који комбинује знања из хемије, биологије и медицине.

Нови хетеронуклеарни комплекси су дизајнирани према стратегији усмереној ка специфичним биомаркерима или биолошким метама које су прекомерно експримиране у ћелијама рака. Циљ је постићи супериорну селективност у односу на лекове на бази платине, уз минимизирање нежељених ефеката (207,208).

Главни циљ ове студије био је синтеза и карактеризација мононуклеарних и четири нова хетеронуклеарна комплекса са супституисаним терпиридинским лигандом, као и одређивање својстава везивања за ДНК и протеине, у циљу постизања веће цитотоксичности. Структуре истражених комплекса  $[\text{ZnCl}_2(\text{terpy}^{\text{tBu}})]$  (**C1**),  $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C2**),  $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-пиразин})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C3**),  $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'-бипиридил})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C4**), и  $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2(\mu\text{-4,4'-бипиридил})\text{ZnCl}(\text{terpy}^{\text{tBu}})\}](\text{ClO}_4)_2$  (**C5**) ( $\text{terpy}^{\text{tBu}} = 4,4',4''\text{-три-tert-бутил-2,2':6,2''-терпиридин}$ ) приказане су на Слици 8.

## 5.1 Синтеза и карактеризација

Ново синтетизовани комплекси опште формуле **C1–C5** су окарактерисани елементалним анализама, UV–Vis, FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR спектроскопијом и ESI-MS спектрометријом. Општи пут синтезе нових хетеронуклеарних комплекса **C2–C5** приказан је на Схеми 2.

Анализом  $^1\text{H}$  NMR спектра комплекса утврђени су мултиплети у опсегу од 9,25 до 8,84 ppm настали преклапањем сигнала који потичу од протона на положајима 3,5 и 3'',5'' (слике 9-13). Синглети који потичу од 3,3',3'' и 5' протона из средњег прстена пиридина јављају се у опсегу од 7,99 до 7,07 ppm, Синглети протона из три-tert-бутил групе појављивали су се у опсегу од 1,48 до 1,23 ppm, док се синглети протона из  $\text{-NH}_3$  групе налазе између 4,75 и 1,46 ppm.

Сигнали који потичу од мостних пиразинских лиганада су у опсегу од 8,99 до 8,74 ppm, док код 4,4'-бипиридил лиганада се преклапају и са сигнаlima 2,2'',3,3'' из терпиридина и појављивали се у опсегу од 8,98 до 8,26. Једина разлика између  $^1\text{H}$  NMR спектра комплекса **C4** и **C5** примећена је у положају сигнала који одговарају протонима из  $\text{-NH}_3$  група, што је последица геометрије око платина(II) јона. У комплексу **C4**, две  $\text{-NH}_3$  групе су у *cis* положају, што доводи до померања сигнала ка већим вредностима (*downfield shift*) у односу на *trans* **C5** изомере.

У IR спектрима испитиваних комплекса траке које се односе на  $\text{-NH}_3$  групу се налазе у опсегу од 3436 до 3293  $\text{cm}^{-1}$ . Вибрационе траке које су специфичне за ароматичне  $\nu(\text{C}=\text{C})$  и  $\nu(\text{C}=\text{N})$  везе у IR спектрима се налазе се у опсегу од 1619 до 1391  $\text{cm}^{-1}$  е (Слике 9-13). Сигнали на 1607  $\text{cm}^{-1}$  одговарају комплексима са мостним пиразинским или 4,4'-бипиридилним лигандима. Траке у опсегу од од 627–615  $\text{cm}^{-1}$  приписани су  $\nu(\text{Zn}-\text{N})$  везама. Траке на 820, 866, 819 и 777  $\text{cm}^{-1}$  одговарају вибрацијама  $\nu(\text{C}=\text{C})$ . Ове вредности указују на присуство двоструких веза у молекулу, што је типично за ароматичне угљоводонике.

UV–Vis спектри комплекса снимани су у води и PBS пуферу. Нису примећене разлике што указује на стабилност ових комплекса у пуферском раствору. Максимуми апсорпција јављају се за комплексе **C2–C5** су приказани на 274, 284, 306, 316 и 328 nm (**C2**) и 274, 284, 318 и 330 nm (**C3**), док је за комплексе **C4** и **C5**  $\lambda_{\text{max}}$  била на 282 nm и 278 nm, Ови резултати указују на различите електронске интеракције између два метална центра и одговарају преносу наелектрисања са лиганда на металне центре.

Масени спектри комплекса **C1–C5** забележени су у позитивном јонском режиму, Сигнал на  $m/z$  177,99 одговара  $[M + K]^+$  адукт јону за комплекс **C1**, Молекуларни јони откривени на  $m/z$  344,02 ( $\pm 0,20$ ) и 488,04 ( $\pm 0,40$ ) одговарају  $[M - Zn]^+$  и  $[M - L - Pt]^+$  фрагментима за **C2** и **C3**, Добијени сигнали молекуларних јона откривени на 1145,94 ( $\pm 0,24$ ) одговарају  $[M + NH_4]^+$  адукт јону за **C4** и **C5**, Такође Сигнали фрагментних јона су такође детектовани.

Мерења проводљивости 1 mM раствора комплекса **C2–C5** су извршена на 25,3 °C у растварачима диметилформамид (DMF) и ацетонитрил. Ови растварачи су изабрани за мерења проводљивости због своје високе диелектричне константе. Вредности проводљивости за комплексе **C2** и **C3** у DMF-у су 131,4 и 155,9  $\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$ , редом, док су у ацетонитрилу 251,2 и 230,1. За комплексе **C4** и **C5**, добијени резултати у DMF-у су 157,2 и 148,0  $\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$ , а у ацетонитрилу 273,2 и 225,3  $\Omega^{-1}cm^2 mol^{-1}$ . Према литературним подацима, добијени резултати се слажу са типом електролита 2:1 и потврђују катјонску природу комплекса (221).

Резултати карактеризације потврђују формирање хетеронуклеарних комплекса са мостним лигандима пиразин и 4,4'-бипиридил.

## 5.2 Испитивање интеракције C1-C5 комплекса са ДНК

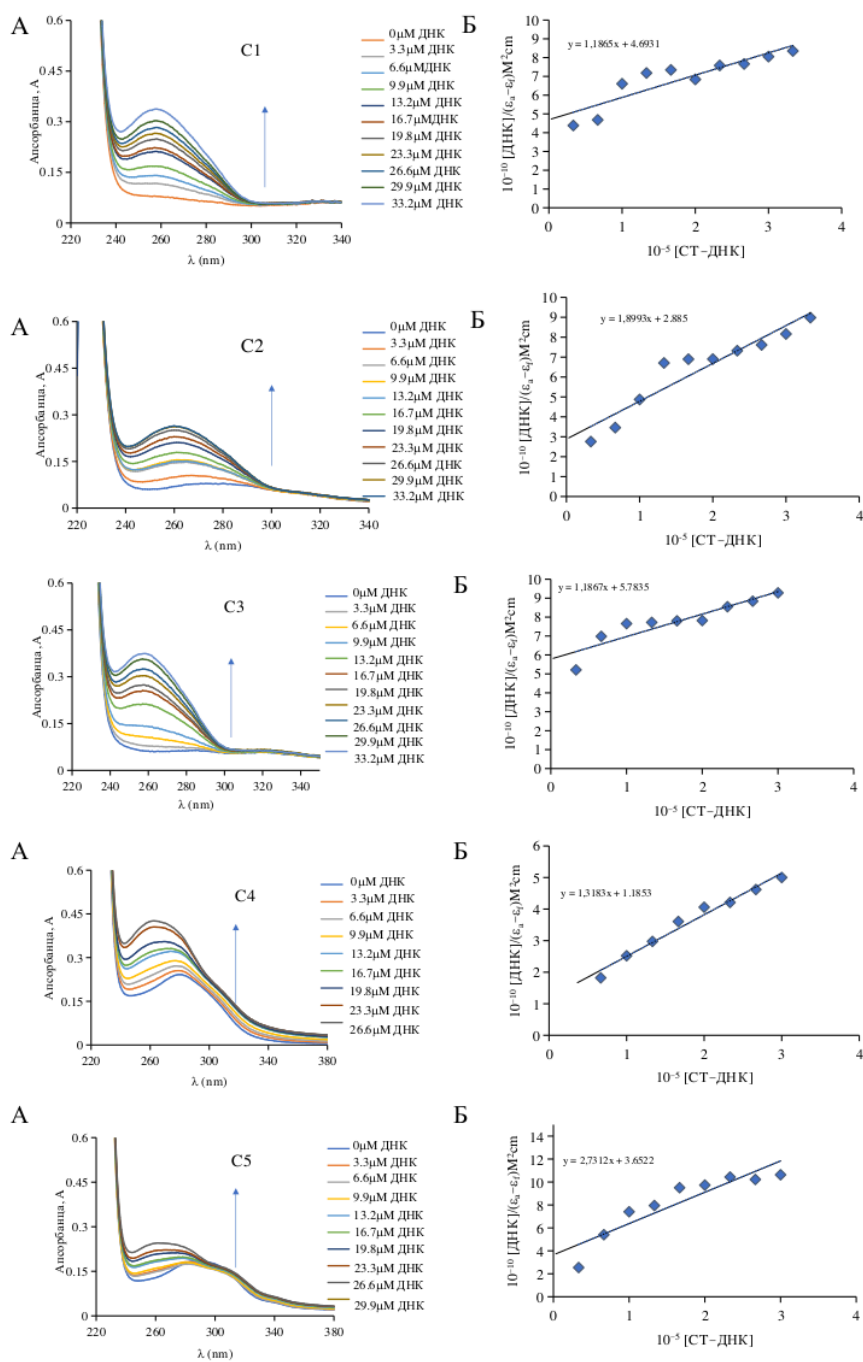
Утврђивање начина координације или интеракције комплекса јона метала са молекулима ДНК врши се применом UV-Vis спектрофотометрије. Комплекси јона прелазних метала могу се везивати за ДНК путем ковалентних или нековалентних интеракција. Када молекул ДНК координује преко N7 атома гуанина, успоставља се ковалентна веза, док нековалентне интеракције могу обухватати интеркалацију, формирање водоничних веза и електростатичке интеракције.

У случају интеркалације, интеракција комплекса са ДНК може довести до опадања (хипохромни ефекат) или до раста раста (хиперхромни ефекат) интензитета апсорбанце. Такође, могу се јавити батохромно (*red shift*), померање апсорпционог максимума ка вишим таласним дужинама односно ниже енергије), или хипсохромно померање апсорпционог максимума (*blue shift*), померање апсорпционог максимума ка нижим таласним дужинама односно више енергије) (169).

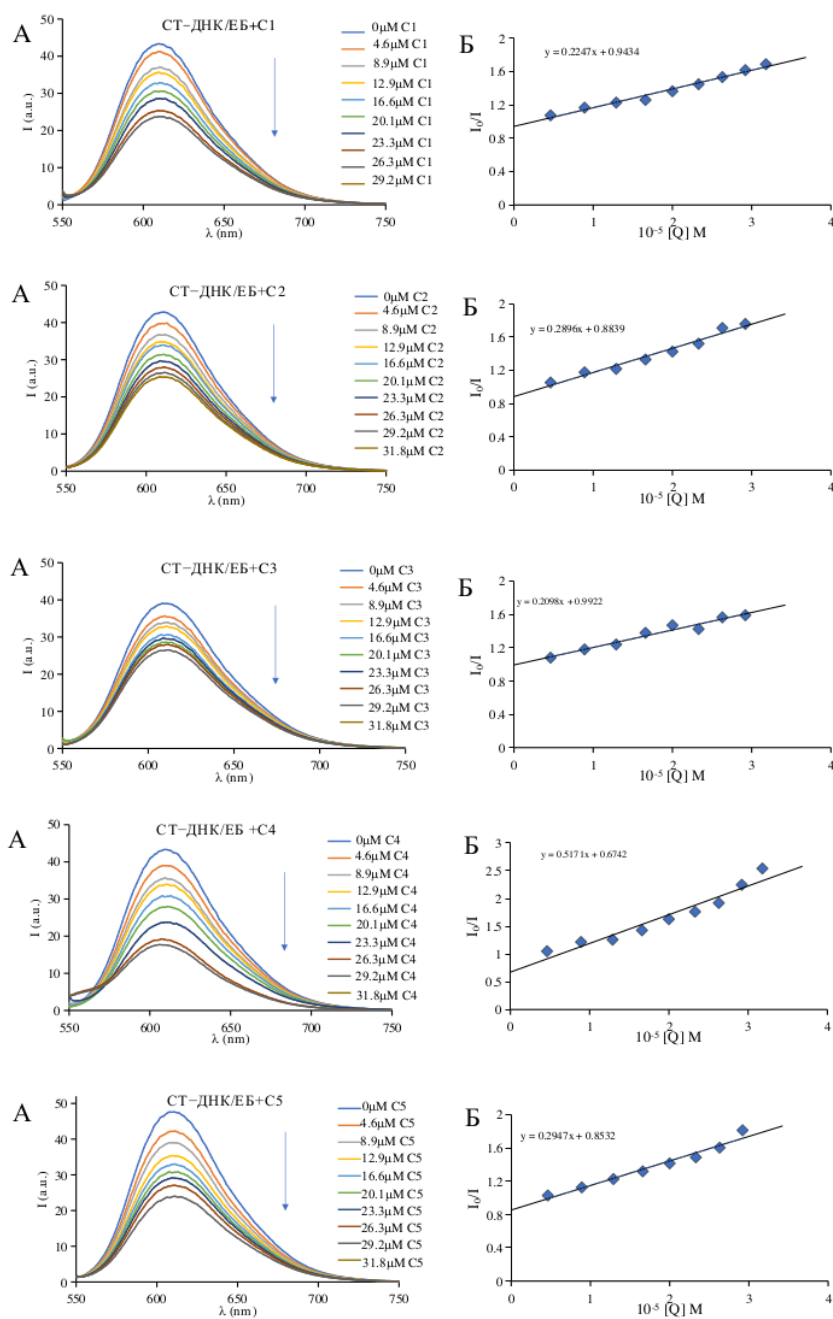
Приликом испитивања интеракција утврђено је да апсорпциона својства комплекса **C4** и **C5** одговарају опсегу који је испитивања интеракција са СТ-ДНК молекулом. Због тока су вредности апсорпције раствора СТ-ДНК кориговане и приписане апсорпцији одговарајућих комплекса. Кориговане вредности наведене су у Табели 2.

Приликом испитивању, сви комплекси су показали одговарајуће вредности  $K_b$  константи (Слика 19). Вредности константи расту следећим редоследом: **C3** < **C1** < **C2** < **C5** < **C4**. Комплекс **C4** је имао знатно вишу вредност константе везивања у поређењу са осталим испитаним комплексима.

Поред тога примећено је да комплекси који садрже трансплатину имају нижу вредност за  $K_b$  константу у односу на аналоге који садрже цисплатину. Насупрот томе, комплекси са мостним лигандом 4,4'-бипиридин имају више  $K_b$  константе у поређењу са аналозима пиразина.



**Слика 19.** (А) Апсорпциони спектри C1-C5 комплекса у присуству растућих концентрација СТ-ДНК различитих концентрација. Пораст апсорпције означен је стрелицом. (В) Зависност  $[\text{СТ-ДНК}] / (\epsilon_A - \epsilon_f) = y$  у функцији  $[\text{СТ-ДНК}]$ .



**Слика 20.** (А) Емисиони спектри СТ-ДНК/ЕБ у присуству и одсуству растућих концентрација **C1-C5** комплекса. Смањење емисије је означено стрелицом. (Б) зависност  $I_0/I$  од концентрације  $[Q]$ .



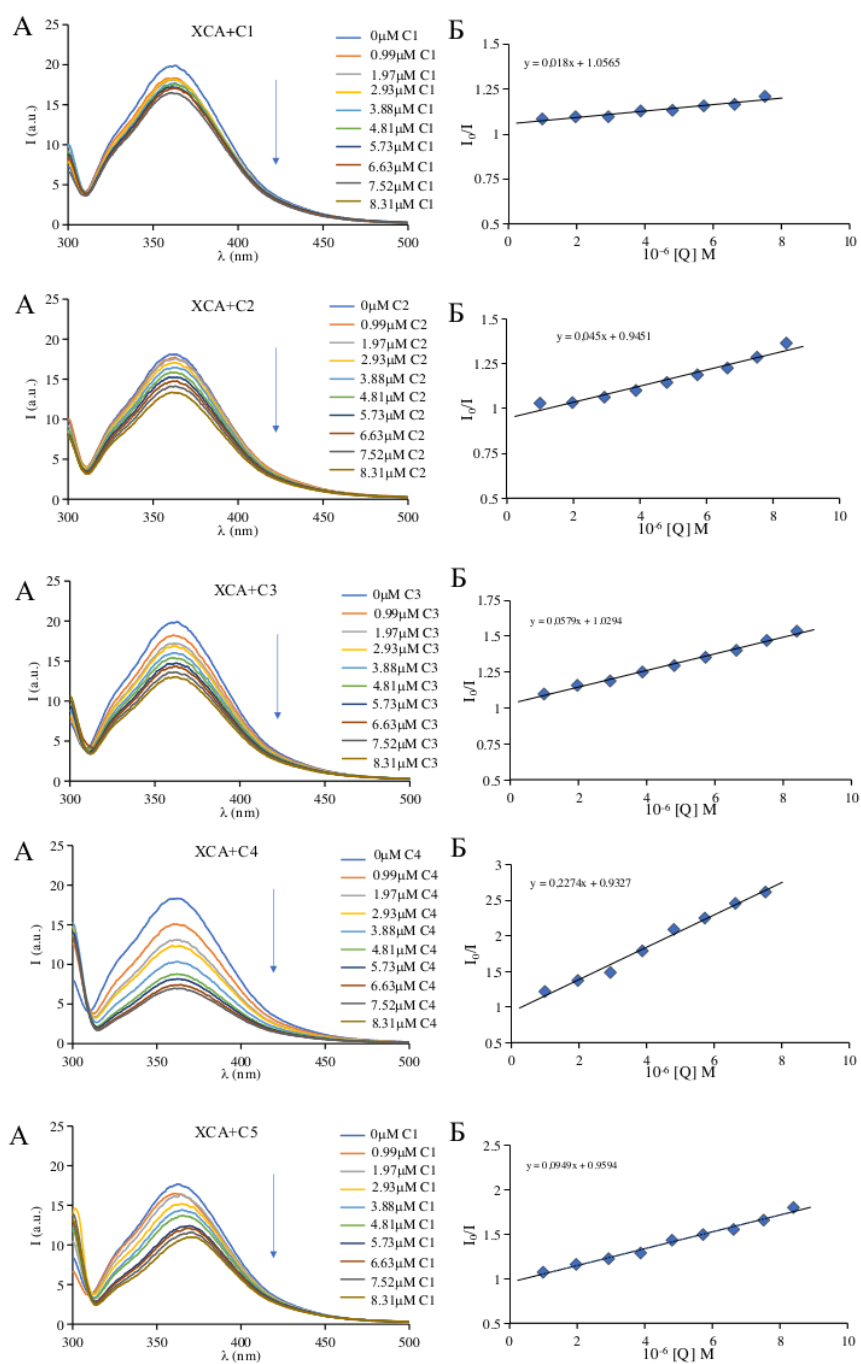
Интеракција **C1-C5** комплекса са ДНК молекулама проучавана је коришћењем емисионе флуоресцентне спектроскопије, при чему се као типичан интеркалатор користи етидијум-бромид (ЕБ). Када се раствор комплекса дода у раствор СТ-ДНК/ЕБ, мерењем промене интензитета флуоресценције раствора примећује се промена у емисионим спектрима. Ове промене могу указивати на смањење или повећање флуоресцентне емисије, што пружа важне информације о интеракцији комплекса са ДНК.

Вредности константи везивања добијених методом флуоресцентне емисије свих испитиваних комплекса утврђене су реда величине од  $10^4$ , што указује на чврсту интеркалациону способност и расту у низу: **C1** < **C3** < **C2**, **C5** < **C4** (Табела 2). Комплекс **C4** је имао највишу вредност. Уочено је да комплекси са трансплатином имају ниже вредности константи везивања у поређењу са аналозима са цисплатином. Насупрот томе, комплекси који садрже мостни лиганд 4,4'-бипиридин показали су веће константе у поређењу са комплексима у којима је пиразин мостни лиганд. Такође, вредности добијене овом методом су у поређењу са UV-Vis анализама биле приближно два пута веће. Емисиони спектри раствора СТ-ДНК/ЕБ у одсуству и присуству испитиваног комплекса приказани су на слици 20.

### 5.3 Испитивање интеракције **C1-C5** комплекса са хуманим серум албумином

**2** Испитивање интеракција између серум албумина и комплекса јона метала привукло је значајно интересовање истраживача, јер ове интеракције могу смањити или повећати биолошку активност лекова, као и довести до развоја нових метода транспорта лекова. У нашим истраживањима користили смо хумани серум албумин (*Human serum albumine*), ХСА. Коришћена је емисиона спектроскопска метода за одређивање константи везивања. Емисиони спектри ХСА у присуству **C1-C5** комплекса приказани су на слици 20. Добијене су различите вредности за константе везивања које расту у низу: **C1** < **C3** < **C2** < **C5** < **C4**. Највећа вредност константе  $K_{sv}$  добијена је за комплекс **C4** реда величине  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , што указује на значајан афинитет комплекса према ХСА молекул. Супротно томе, најнижа  $K_{sv}$  вредност добијена је за комплекс **C1**. Уочено је да комплекси који садрже трансплатински део имају ниже константе у односу на њихове цисплатинске аналоге. Поред тога, комплекси са бипиридинским мостним лигандима показали су веће константе у поређењу са комплексима који садрже пиразински мостни лиганд.

При поређењу добијених константи за хетеронуклеарне **C2-C5** комплексе са константама комплекса од којих су новосинтетизовани комплекси потекли (трансплатина, цисплатина и комплекс **C1**), примећује се да за комплексе **C2**, **C4** и **C5** (Табела 1) су добијене значајно више вредности константи у односу на почетне комплексе. Ипак, за **C2** комплекс вредности су сличне вредностима добијеним за почетне комплексе. Ови резултати указују на то да структура хетеронуклеарних комплекса доприноси побољшаној реактивности, посебно у случајевима комплекса **C2**, **C4** и **C5**, док комплекс **C2** показује реактивност сличну као почетни комплекси (185-186). Уколико упоредимо резултате наше студије са резултатима који су добијени за структурно сличне хетеронуклеарне комплексе типа Pt(II)-Zn(II) (191) можемо приметити да комплекси имају сличну реактивност током интеракције са СТ-ДНК молекулама.



**Слика 21.** (А) Емисиони спектри ХСА у присуству и одсуству растућих концентрација C1-C5 комплекса. Смањење емисије је означено стрелицом. (Б) зависност  $I_0/I$  од концентрације  $[Q]$ .

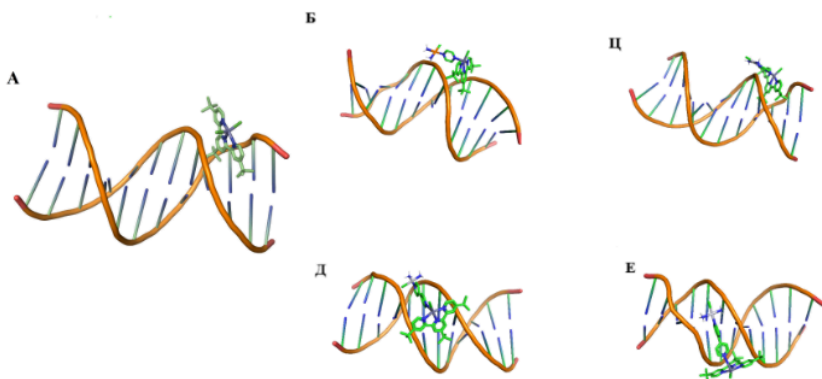
Поред тога, хетеронуклеарни Pt(II)-Pd(II) комплекси и хомонуклеарни Pt(II) и Pd(II) комплекси показују упоредиве константе добијене проучавањем интеракција са СТ-ДНК и протеинима (173), рефлектујући карактеристике проучаваних комплекса. Ово запажање јасно указује на то да су константе за динуклеарне комплексе генерално реда величине  $10^4$ , што указује на чврсто везивање како за молекуле ДНК, тако и за албумин.

## 5.4 Анализа резултата добијених симулацијом молекулског докинга

### 5.4.1 Интеракција са ДНК и ХСА

Молекулски докинг је метода у биоинформатици и структурној биологији која се користи за предвиђање начина на који се молекули (обично лекови) везују за одређене биолошке макромолекуле (попут протеина или ДНК). Ова метода је веома важна у процесу откривања лекова, јер омогућава истраживачима да процене афинитет и специфичност везивања различитих малих молекула на циљне протеине.

Метода молекулског докинга коришћена је за предвиђање начина везивања **C1-C5** комплекса за ДНК. Добијени резултати приказани су у Табели 3. У табели су приказани и литературни резултати за структурно сличне комплексе типа Pt(II)-L-Zn(II). Када упоредимо вредности где је у систем укључен један хлор (Табела 3) са вредностима испитиваних комплекса **C2-C5** (са *tert*-бутил групом) можемо приметити негативније вредности за енергију везивања (од  $-9.76$  до  $-11.20$  kcal·mol<sup>-1</sup>) него у случају комплекса **C1a-C4a** (од  $-4.92$  до  $-5.84$  kcal·mol<sup>-1</sup>). Константе инхибиције за **C1-C5** комплексе су ниже (70,24, 45,85, 12,10 и 5,93 μM) него за комплексна једињења **C1a-C4a** (52,15, 117,06, 248,49 и 230,84 μM). Може се рећи да комплекс **C1** има најсличније вредности у поређењу са раније испитиваним комплексима ( $6,21$  kcal·mol<sup>-1</sup> са  $K_i$  од  $28.18$  μM)

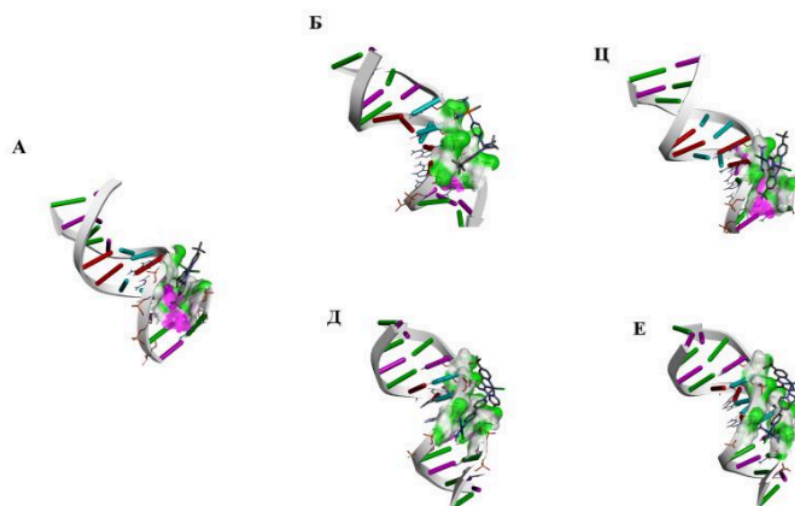


**Слика 22.** Најбоље докинг позиције комплекса **C1-C5**: (А) **C1** (Б) **C2** (Ц) **C3** (Д) **C4** и (Е) **C5**.

Приликом поређења одговарајућих инхибиторних константи са константама раније синтетизованих комплекса (**C1b–C4b**) (415) (без једног -C1 или *tert*-бутилне групе унутар), може се закључити да је интеракција боља у случају **C1–C5** комплекса са ДНК (Табела 3). Вредности за енергије везивања за **C3b** и **C4b** комплексе и <sup>1</sup>осе  $-8,18$  и  $-8,07 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (415), али су боље вредности добијене за комплексе **C2–C5** ( $-9,76$ ,  $-10,01$ ,  $-10,80$  и  $-11,22 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Тренд је такође бољи када је реч о константама инхибиције. Вредности за  $K_i$  комплекса **C1b–C4b** су у распону  $\mu\text{M}$  (1,01, 1,22, 18,05 и 16,30  $\mu\text{M}$ ), док у случају комплекса **C2–C5** (70,24, 45,85, 12,10 и 5,93  $\mu\text{M}$ ),

Представљени подаци предвиђају јаче везивање за ДНК у случају **C2**, **C3**, **C4** и **C5**, комплекса. Очигледно је да се са увођењем *tert*-бутилне групе у систем јављају интеракције јачег интензитета (већа негативна  $\Delta G$  енергија и ниже вредности  $K_i$  (Табела 2). Најбоље позиције доковања су представљене на Слици 22. Ради прецизности метода је проверена за *bis*(1,10-фенантролин)платина(II) комплекс и 7DJW.

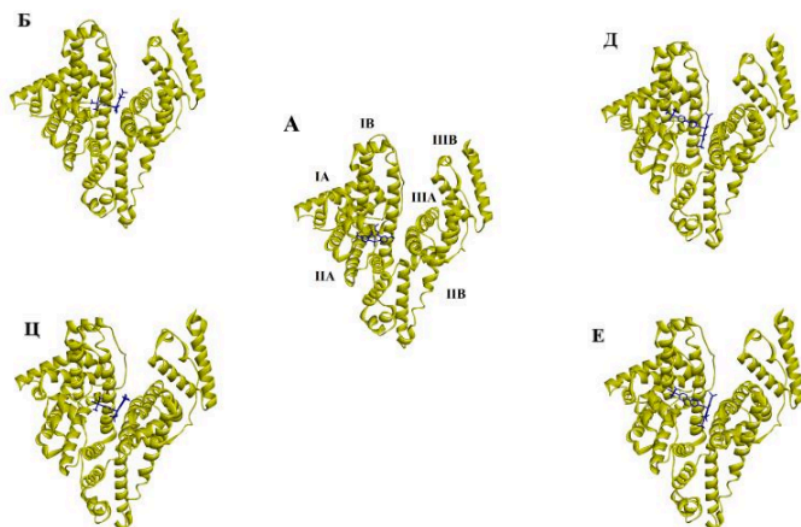
Примарни допринос интеракцијама у случају комплекса **C1** потиче од Ван дер Валсових сила. У случају комплекса **C2**, доприноси потичу од конвенционалних водоничних веза и Ван дер Валсових сила, затим следе системи **C3–C5** (Слика 23).



Слика 23. Доприноси интеракција за комплексе **C1–C5**: (А) **C1** (Б) **C2** (Ц) **C3** (Д) **C4** и (Е) **C5**

Метода молекулског докинга је такође коришћена за утврђивање најпогоднијег места везивања и испитивања интеракција између **C1–C5** комплекса и ХСА. Највећи афинитети везивања примећени су за **C2** ( $\Delta G = -43,30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) и **C3** ( $\Delta G = -43,05 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), док је систем **C1** показао нешто нижи афинитет ( $\Delta G = -37,02 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). С друге стране, комплекси **C4** ( $\Delta G = -29,95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) и **C5** ( $\Delta G = -29,58 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) показали су најслабију интеракцију. Стога, је изабрано место I за које се чврсто везују

комплекси **C1**, **C2** и **C3**. Међутим, у случају **C4** и **C5** комплекса може се очекивати везивање за обе стране (Табела 3).



**Слика 24.** Интеракције **C1–C5** комплекса и ХСА (обојен жутом бојом) са подоменима (означеним под а). Комплекси су обојени тамно плаво: (А) **C1**; (Б) **C2**; (Ц) **C3**; (Д) **C4**; и (Е) **C5**.

Најбоље докогинг позиције везивања **C1–C5** комплекса за ХСА приказане су на Слици 24. Када је реч о интеракцијама комплекса **C1** са ХСА, доприноси углавном потичу од Ван дер Валсових сила,  $\pi$ - $\sigma$ , алкил и  $\pi$ -алкил веза, док за комплексе **C2** и **C3** доминантне су конвенционалне водоничне везе,  $\pi$ - $\sigma$ , алкил и  $\pi$ -алкил везе. Највећи доприноси интеракцијама комплекса **C4** и **C5** са ХСА потичу од конвенционалних водоничних веза, као и од  $\pi$ - $\sigma$  и  $\pi$ -донорских веза.

## 5.5 Антитуморске активности хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II)

### 5.5.1 Процена цитотоксичности у *in vitro* условима хетеронуклеарних комплекса платине(II)/цинка(II) МТТ тестом

У истраживањима коришћене су различите ћелијске линије карцинома, укључујући мишије колоректални карцином (CT26), људски колоректални карцином (HCT116 и SW480), који су добијени од ATCC, САД, и мишије мезенхимске матичне ћелије (mMSC, Gibco, Њујорк, САД), које су одржаване у комплетном DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagle Medium), инкубиране на 37°C у влажној атмосфери са 5%



угљен-диоксид ( $\text{CO}_2$ ). Коришћене су само суспензије ћелија које су имале преко 95% вијабилност, одређени су бојењем Трупан blue методом. Цитотоксични ефекти пет новосинтетисаних комплекса, заједно са цисплатином, процењени су методом МТТ теста у складу са претходно успостављеним протоколима (223). Током фазе експоненцијалног раста, ћелије су прикупљене из културних боца, пребројане и затим посејане у 96-ћелијске културне плоче у густини од  $5 \cdot 10^3$  ћелија по бунару. Након тога, ћелије су изложене различитим концентрацијама новосинтетизованих комплекса и цисплатина (у распону од 1,17 до 150  $\mu\text{M}$ ) током трајања од 48 сати, при чему је свеже комплетан медијум служио као контрола. Резултати су квантитативно приказани у односу на контролу (нетретирани ћелије), пружајући упоредну меру цитотоксичности. Такође, израчунате су вредности  $\text{IC}_{50}$ , које представљају концентрацију потребну да се инхибира 50% вијабилности ћелија, коришћењем Microsoft Office Excel 2010. На крају, подаци су представљени као проценти вијабилних ћелија у складу са методологијом описаном у референтној студији (223), олакшавајући свеобухватно разумевање антитуморског потенцијала ових једињења.

Резултати су показали да хетеронуклеарни комплекси платине(II) и цинка(II) (**C1–C5**) имају снажан цитотоксичан ефекат на људске и мишје ћелије колоректалног карцинома, уз релативно ниску токсичност према нормалним mMSC ћелијама. Комплекс **C1** је показао селективну цитотоксичност, смањену према нормалним ћелијама, а повећану према туморским линијама, што указује на његов потенцијал за циљану терапију рака уз смањену штету за здраве ћелије. Због тога је комплекс **C1** изабран за даље истраживање. Слични цитотоксични исходи су уочени са комплексима цинка(II)-терпиридина, који су смањили вијабилност ћелија код различитих карцинома, укључујући аденокарцином плућа (A549), хепатоцелуларни карцином (Bel-7402), аденокарцином дојке (MCF-7) и сквамозни карцином једњака (Eca-109), као што је наведено у студији Ли и сарадника (224). Такође, комплекси платине(II)-терпиридина су показали значајне антипролиферативне ефекте у различитим ћелијским линијама, као што су људски сквамозни карцином (A431). Људски сквамозни карцином (A431), карцином грлића материце (HeLa), карцином дојке (MCF-7), карцином плућа малих ћелија (A549), као и A549 сублинија отпорна на цисплатину (A549/DDP) (225).

### 5.5.2 Процена апоптотске смрти ћелија изазване C1 комплексом

Процена апоптозе код ћелија које су биле подвргнуте третману спроведена је коришћењем Annexin V и Propidium Iodide двоструке методе бојења у складу са методологијом описаном у претходним студијама (226). Овај приступ је омогућио одређивање процента апоптотских ћелија. У даљим експериментима, ћелије су фиксиране и пермеабелизоване помоћу пермеабелизационог бафера. Након тога, ћелије су инкубирани са специфичним антителима која циљају Bcl-2, Вах и каспазу-3, пратећи процедуре описане у претходним истраживањима (226). Анализа ових третиранх ћелија извршена је коришћењем проточног цитометра FACS Calibur, а добијени подаци су детаљно анализирани софтвером FlowJo (v10.8.2). Ова техника је пружила свеобухватну и детаљну процену апоптотичког одговора код ћелија након излагања **C1** комплексу, што је помогло у расветљавању механизма индукције ћелијске смрти.

Оштећена ћелија може активирати више различитих механизма апоптотске смрти како би осигурала своје уништење. Док је каспаза-зависна апоптоза најефикаснији и најбржи процес, у случају мутација или инхибиције, ћелија може активирати спорији каспаза-независни механизам апоптозе (227). У том процесу, централну улогу игра Bcl-2

породица протеина, која регулише не само апоптозу, већ и некрозу и аутофагију. Промене у експресији и функцији ових протеина доприносе развоју рака и пружају могућности за циљану терапију (228).

Проапоптотски и антиапоптотски чланови Bcl-2 фамилије, као што су Вах и Bcl-2, играју важну улогу у контроли апоптозе код различитих врста карцинома. Њихово деловање се базира на формирању димера, при чему Bcl-2/Вах хетеродимери инхибирају апоптозу, док Вах/Вах хомодимери подстичу апоптозу (229,230). Ови протеини, смештени у митохондријалној мембрани, могу регулисати ослобађање цитохрома c, који је неопходан за активацију каспаза и апоптозу (231).

Поред тога, протеини попут NF-κB, Bcl-2 и Вах представљају важне маркере апоптотске активности ћелија. NF-κB игра кључну улогу у регулисању односа између запаљења и канцерогенезе. Инхибиција NF-κB у ћелијама рака може довести до апоптозе и заустављања пролиферације, што је кључно за реакцију на терапије попут цитостатика и зрачења (232,233).

Пропустљивост митохондријалне мембране је под контролом равнотеже између проапоптотских и антиапоптотских чланова породице Bcl-2. Везивање Bcl-2 за Вах спречава апоптозу, док се пораст експресије проапоптотских протеина попут Вах-а везује за индукцију ћелијске смрти (234,235). Висока експресија Bcl-2 може успорити раст ћелија, али њено прекомерно присуство подстиче смрт, док смањена експресија води до резистенције на апоптозу, што је честа појава код карцинома (236).

На крају, поремећаји у овом систему, посебно инактивирање проапоптотских протеина, чести су код малигних ћелија, што утиче на осетљивост тумора на терапије. Промене у експресији Bcl-2 протеина могу значајно утицати на успех лечења, чиме Bcl-2 постаје важан прогностички маркер (237).

Резултати, приказани на Слици 15, показали су да је комплекс C1 индуковао апоптозу и некрозу у значајном проценту СТ26 ћелија након 24 сата третмана. Ово двоструко деловање указује на његов потенцијал као снажног анти-карциномског агенса. Третман са комплексом C1 повећао је број Вах-позитивних ћелија, смањио Bcl-2-позитивне ћелије, и повећао експресију каспазе-3, што сугерише да комплекс C1 делује кроз индукцију апоптозе у СТ26 ћелијама.

Слично томе, у сродном контексту, NCI-H460 ћелије рака, које су линија хуманих карцинома великих ћелија плућа, биле су подвргнуте третману динуклеарним платина(II) комплексима. Ови комплекси садрже 4'-супституисане-2,2':6',2''-терпиридинске лиганде и администрирани су у трајању од 24 сата. Након овог третмана, дошло је до значајног повећања процента апоптотских ћелија, што је у тесној корелацији са излагањем овим специфичним лигандима (238). Такође, студије су показале да Zn(II) терпиридински комплекси играју значајну улогу у процесу апоптозе (239). Ови комплекси, слични комплексу C1, имају потенцијал да изазову апоптозу у ћелијама.

Остварени резултати су у складу са сличним истраживањима која су показала да рутенијум(II) терпиридински комплекси-[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl (Ru-1) и [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl (Ru-2) испољавају значајну in vitro цитотоксичност на хумане ћелије карцинома грлића материце (HeLa) и карцинома плућа (A549), док на здраве ћелије,



попут људских фибробласта плућа (MRC-5), имају умерену токсичност. Вредности IC<sub>50</sub> за Ru-1 кретале су се између 32,80 и 66,30 µM, а за Ru-2 између 72,80 и 110,80 µM, што је у складу са претходним студијама (240-241).

### 5.5.3 Ефекти комплекса C1 на регулаторе ћелијског циклус и пролиферацију у ћелијама карцинома CT26

Наше истраживање се наставило како би се испитали потенцијални ефекти новосинтетисаног комплекса C1 на динамику ћелијског циклуса CT26 туморских ћелија. Циљ је био да се идентификује експресија Ki67, као и било какве промене у прогресији ћелијског циклуса туморских ћелија третираног комплексом C1 у поређењу са нетретираним ћелијама. Експеримент је и укључивао групу ћелија третираних концентрацијама које одговарају вредностима IC<sub>50</sub> комплекса и контролна група нетретираних ћелија. Те ћелије су култивисане у боцама од 25 mL. Након третмана IC<sub>50</sub> концентрацијама комплекса C1, ћелије су подвргнуте инкубацији од 24 сата, затим трипсинизацији, троструком испирању PBS-ом и бројању ћелија. Свака епрувета са узорком је затим третирана са специфичним антителом које циља Ki67 (*eBioscience, Сан Диего, СА, САД*)/1 µL Vybrant® DyeCycle™ Ruby боје (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA*), а затим анализирана проточним цитометром FACS Calibur (*BD Biosciences, Сан Хозе, СА, САД*). Анализирано је најмање 15000 догађаја по узорку. Анализа података је извршена коришћењем софтвера FlowJo vX.0.7, што је омогућило детаљну процену фаза ћелијског циклуса и било каквих ефеката које је индукован комплексом C1.

Протеин Ki67 је нехистонски протеин са две изоформе, масе 345kD и 395kD, за који се верује да игра кључну улогу у стабилизацији хроматина, с обзиром на његову присутност у густом фибриларном региону једарца. Његова експресија је строго контролисана и укључује процесе фосфорилације и дефосфорилације током митозе, а регулише се протеолитичким механизмима, што доводи до кратког полуживота протеина од 60 до 90 минута (242). Његова важност за ћелијску пролиферацију је потврђена, јер је утврђено да уклањање Ki67 помоћу антисенс нуклеотида зауставља процес пролиферације ћелија. Његова улога у организацији ДНК је посебно изражена током ране G1 фазе (243).

Ki67 антитело је прво моноклонско антитело које препознаје нуклеарни антиген пролиферишућих ћелија, а добијено је имунизацијом мишева са ћелијама L428 Hodgkin-овог лимфома. Названо је по граду Кил у Немачкој, одакле потиче (244). MIB-1 је најчешће коришћено антитело које открива Ki67 антиген, који је присутан само у ћелијама које су у фази пролиферације, односно у касној G1, S, G2 и M фази циклуса, али не и у G0 фази (245). Експресија Ki67 се повећава од средње G1 фазе, кроз S и G2, до врхунца у M фази (246).

Ki67 се широко користи у имунохистохемијским анализама како би се проценила пролиферативна активност тумора, а такође помаже у разликовању бенигних од малигних тумора. У бенигним туморима митотска активност је углавном ниска или одсутна, док је у малигним туморима значајно већа и у корелацији са напредовањем болести (245). Недостатак примене антитела на хумани Ki67 је честа унакрсна реакција, па су развијени еквиваленти као што су MIB и TuBV за бољу процену функције Ki67 протеина. MIB-1 се користи за маркирање Ki67 код различитих врста сисара, док MIB-5 реагује само на Ki67 код пацова (247,248).

Наши резултати показују да комплекс **C1** ефикасно зауставља CT26 карциномске ћелије у G0/G1 фази, вероватно услед молекуларних промена након третмана. Примећено је и смањење ћелија у S фази, што указује на инхибицију репликације ДНК и успоравање ћелијског циклуса. Ово сугерише да комплекс **C1** омета ћелијску деобу, важну за раст тумора. Резултати такође показују да комплекс смањује број ћелија позитивних на циклин D, без значајних промена у експресији циклина E, што указује на специфично заустављање циклуса у G1 фази.

**3** Циклин D1 игра кључну улогу у преласку ћелија из G1 у S фазу циклуса, формирајући комплексе са циклин-зависним киназама CDK4/6, што доводи до фосфорилације Rb протеина и активације гена важних за прогресију циклуса (249). У поређењу са другим циклима D типа, циклин D1 је чешће нерегулисан у различитим туморима, што резултира брзом пролиферацијом ћелија (250). Његова експресија је у корелацији са хормонским рецепторима, посебно у хормон-зависним туморима попут карцинома дојке (251,252). Истраживања о улози циклина D1 у колоректалном карциному су контрадикторна. Док неке студије показују позитивну експресију у 23,1% случајева (253), друге указују на 55% и повезују високу експресију са повољном прогнозом (254). Међутим, нека истраживања показују да повећана експресија циклина D1 скраћује **преживљавање** (255). Такође, студија је показала да је експресија овог протеина **повољан прогностички фактор код мушкараца, али не и код жена** (256). Ипак, већина студија повезује високу експресију са лошијом прогнозом и краћим преживљавањем без релапса (257).

У овој фази студије, CT26 ћелије карцинома су третиране IC<sub>50</sub> концентрацијом комплекса **C1** или остављене као контрола у медијуму током 24 сата. Након фиксирања и пермеабилizације, ћелије су инкубирane са антителима усмереним на кључне регулаторе ћелијског циклуса, као што су Циклин D, Циклин E, p21 и p-AKT. Анализа је извршена коришћењем проточног цитометра FACS Calibur, а подаци су обрађени **софтвером FlowJo (v10.8.2)**. Претходна истраживања су открила да одређена **комплексна једињења рутенијума(II)** могу узроковати **заустављање ћелија у G0/G1 фази** кроз активацију p53 и повећање p21 протеина, који **блокира активност CDK и инхибира ћелијски циклус, што** доводи до заустављања и индукције апоптозе (258-260).

## 6. ЗАКЉУЧАК

Ново-синтетисани хетеронуклеарни комплекси Pt(II)-L-Zn(II) дизајнирани су на основу стратегије усмерене ка специфичним биомаркерима и биолошким метама које су прекомерно присутне у туморским ћелијама. Ова студија по први пут показује да новосинтетисани Pt(II)-L-Zn(II) комплекс C1 показује значајну цитотоксичност према ћелијама колоректалног карцинома, али не и према нетуморским ћелијама *in vitro*, што указује на то да комплекс C1 има потенцијал да постане перспективан кандидат за анти туморску терапију.

На основу добијених резултата, изведени су следећи закључци:

- Нови хетеронуклеарни комплекси Pt(II)-L-Zn(II) су окарактерисани елементарном анализом, UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR и ESI-MS спектрометријом, где карактеризације потврђују формирање хетеронуклеарних комплекса са мостним лигандима пиразина и 4,4'-бипиридила.
- Супституенти на тридентатним терпиридинским лигандима, као што су *tert*-бутил групе, значајно утичу на антипролиферативни ефекат и начин везивања ДНК код мононуклеарних и хетеронуклеарних платинум(II)/цинк(II) комплекса.
- Интеракција C1-C5 комплекса са ДНК молекулима указује на чврсту интеркалациону способност и расте у низу: C1 < C3 < C2, C5 < C4 . Комплекс C4 има највишу вредност.
- Студије молекулског докинга су потврдиле да је везивање комплекса C1 за ДНК резултат Ван дер Валсових сила, док је везивање комплекса C2-C5 резултат конвенционалних водоничних веза и Ван дер Валсових сила.
- Сви испитани комплекси показали су одговарајући афинитет везивања за ХСА молекул, Вредности константи се повећавају следећим редоследом: C1 < C3 < C2 < C5 < C4. Комплекс C4 је имао највећу  $K_{sv}$  вредност, док је најнижа  $K_{sv}$  вредност припадала комплексу C1.
- На испитиваним линијама туморских ћелија, новосинтетисани комплекси C1-C5, посебно комплекс C1, показују дозно зависну цитотоксичност и јачу селективност према туморским ћелијама у односу на мезенхималне матичне ћелије, у поређењу са цисплатином.
- Комплекс C1 повећава проценат ћелија карцинома колоне у раној и касној апоптози.
- Комплекс C1 поспешује експресију Вах у анализираним сојевима канцерогених ћелија, док редукује експресију антиапоптотског протеина Bcl-2.
- C1 комплекс ефикасно зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази, смањује експресију циклина D, без значајних промена у експресији циклина E.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Bhatt P, Lalani R, Vhora I, Patil S, Amrutiya J, Misra A, et al. Liposomes encapsulating native and cyclodextrin enclosed paclitaxel: Enhanced loading efficiency and its pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm* 2018; 536(1):95-107.
2. Croce CM. Oncogenes and Cancer. *New England J Med*. 2008; 358(5):502-11.
3. Patel J, Amrutiya J, Bhatt P, Javia A, Jain M, Misra A. Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumor cells. *J Microencapsul*. 2018; 35(2):204-17.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
5. Organization WH. Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; 2018.
6. Omran AR. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*. 1971;49(4):509-38.
7. Gersten O, Wilmoth JR. The Cancer Transition in Japan since 1951. *Demographic Research*. 2002;7(5):271-306.
8. Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden in World Cancer Report 2014. Editors BePHErd W Stewart, Christopher P Wild Lyon: Naturaprint. 2014.
9. Maule M, Merletti F. Cancer transition and priorities for cancer control. *Lancet Oncol*. 2012;13(8):745-6.
10. Marvin C. Rectal Prolapse or Procidentia. In: Marvin C, editor. *Colon and Rectal Surgery*. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
11. Wexner S, Maricio J. Anatomy and Embryology of the Anus, Rectum and Colon. In: Marvin C, editor. *Colon and Rectal Surgery*. 5th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1–30.
12. Muldoon J. History of colorectal surgery. In: Mazie r W, Levien D, MA L, Senagore A, editors. *Surgery of the Colon, Rectum, and Anus*. illustrate. Philadelphia: WB Saunders; 1995.
13. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis*. 2001;33(4):372-88.
14. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019 Oct 19;394(10207):1467-1480.
15. J Ferlay, D M Parkin, E Steliarova-Foucher Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010 Mar;46(4):765-81.
16. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet*. 2005;365(9454):153-165.
17. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 2007; 21: 2525-38.



18. Pino MS, Chung DC: The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2059-72.
19. Bond JH. Colonic tumors. *Endoscopy* 1998; 30: 150-7.
20. Levin T, Jamieson L, Burley D, Reyes J, Oehrli M, Caldwell C. Organized colorectal cancer screening in integrated health care systems. *Epidemiol Rev.* 2011;33:101-10.
21. Vernon WS, Meissner H, Klabunde C, Rimer KR, Ahnen JD, Bastani R, et al. Measures for ascertaining the use of colorectal cancer screening in behavioral, health services, and epidemiologic research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(6):898-905.
22. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:11-25.
23. D Linardoutsos et all. Primary colonic squamous cell carcinoma: a case report and literature review. *Ann R Coll Surg Engl.* 2020 Nov; 102(9): e1–e7.
24. Francesco Maione et all. Diagnosis and Management of Rectal Neuroendocrine Tumors (NETs). *Diagnostics (Basel).* 2021 May; 11(5): 771.
25. C Randall C, Brendan F S, Steven K. Colorectal sarcoma: more than a gastrointestinal stromal tumor. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2018. Jul;16:3:42.
26. Stanojević G, Stojanović M, Jovanović M, Stojanović M, Jeremić M, Branković B, Ignjatović N, Katić V. Primarni kolorektalni limfomi. *Vojnosanitetski pregled.* 2009; 6(4):295-301.
27. Vlajinac H, Marinkovic J, Koccev N, Adanja B, Šioetić S, Pekmezović T, Živaljević VI. Mortality trend in Serbia excluding the provinces, 1973-1994. *Srp Arh Celok Lek* 2000; 128: 309-315.
28. Lieberman DA. Clinical practice. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 1179-87.
29. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-49.
30. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020; 70(3):145-64.
31. White A, Joseph D, Rim SH, Johnson CJ, Coleman MP, Allemani C. Colon cancer survival in the United States by race and stage (2001-2009): Findings from the CONCORD-2 study. *Cancer.* 2017 Dec 15;123 Suppl 24:5014–36.
32. Lawrence PF, Richard M. Bell RM, Merrill T. Dayton MT(eds): *Essentials of General Surgery* Lippincott Williams & Wilkins, 2012, pp 316-318.
33. Fidler MM, Soerjomataram I, Bray F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *Int J Cancer.* 2016; 139(11):2436-46.
34. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022; 72(1):7-33.
35. Institut za javno zdravlje Srbije “Jovan Jovanović Batut” Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji, 2009. Beograd: Institut za javno zdravlje.

36. Cardoso R, Guo F, Heisser T, Hackl M, Ihle P, De Schutter H, et al. Colorectal cancer incidence, mortality, and stage distribution in European countries in the colorectal cancer screening era: an intePHKtional population-based study. *Lancet Oncol.* 2021; 22(7):1002-13.
37. Araghi M, Soerjomataram I, Bardot A, Ferlay J, Cabasag CJ, Morrison DS, et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019; 4(7):511-8.
38. Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(4):250-81.
39. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. IntePHKtional Agency for Research on Cancer. Accessed March 2nd 2023.
40. Hamilton SR, Bosman FT, Lyas M, Morreau H, Nakamura SJ, Riboli E, Sobin LH: Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise D (eds): WHO Classification of Tumours Of the Digestive System (4th Edn), IARC, Lyon 2010, pp 132-146.
41. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, and Bray F: Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 2017, 683-691.
42. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, and Parkin DM: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC Cancer Base, Globocan 2008, No 10, pp 1027-1056, IARC Lyon.
43. Triantafyllidis J.K., Nasioulas G., Kosmidis P.A. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 2009;29:2727-2737.
44. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon. 2002. *Gastrointest Endosc* 2003;58 (6): S3-4.
45. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Phipps AI, Passarelli MN, M. Grady WM, Upton MP, et al. Colorectal endoscopy, advanced adenomas, and sessile serrated polyps: implications for proximal colon cancer. *Am J Gastroenterol.* Aug 2012; 107(8): 1213-19.
46. Levine JS, Ahnen DJ. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med* 2006; 355: 2551-2557.
47. Heitman SJ, Ronksley PE, Hilsden RJ et al. Prevalence of adenomas and colorectal cancer in average-risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Clin, Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1272-8.
48. Snover DC, Ahnen DJ, Burt RW et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010: 160-5.
49. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *Int J Oncol* 2013; 43 (4): 973-84.
50. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759- 67.
51. Bujanda L, Cosme A, Gil I, I Arenas-Mirave JI. Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(25): 3103-11.



52. Armaghany T, Wilson JD, Quyen Chu Q, Mills G Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012; 5(1): 19–27.
53. Hisamuddin IM, Vincent WY. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2006; 2 (2): 53–59 69.
54. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2): 11– 27.
55. Lengauer C, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643–649.
56. Berg M, Søreide K. Genetic and Epigenetic Traits as Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(12): 9426–39.
57. Frank SA. Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution. Multistage Progression Princeton (NJ): Princeton University Press; 2007.
58. Nojadeh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *EXCLI J.* 2018; 17:159–68.
59. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 15;22(4):813–20.
60. Chen W, BJ S, Frankel W. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol.* 2017; 4(12):24.
61. Hughes LA, Khalid-de Baker CA, Smits KM, et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825: 77–85.
62. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016; 13(1):120-35.
63. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53: 1137–44.
64. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988–93.
65. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology* 2020 ;158(2):291-302.
66. Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, et al. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17: 3208–15.
67. De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 ;11(7):1017-42.
68. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics, and function of epithelial to mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003; 120: 1351–1383.
69. Kalluri, R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009; 119, 1417–1419.
70. Kang, Y.; Massague, J. Epithelial to mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277–279.

71. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871–890.
72. Tsai JH, Yang J. Epithelial to mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* 2013; 27: 2192–2200.
73. Bresalier SR: Malignant neoplasms of the large intestine. In: Feldman M, Friedman L.S, Brandt L.J(eds): *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. (9th Edn), 2006, Saunders Elsevier 2006, Chapter 120, pp.2786-7.
74. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H et al. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 57-64.
75. Alexiusdottir KK, Moller PH, Snaebjornsson P, Jonasson L, Olafsdottir EJ, Bjornsson ES et al. Association of symptoms of colon cancer patients with tumor location and TNM tumor stage. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47: 795-801.
76. Jankovic S, Vlajinac H, Bjegovic V, Marinkovic J, Sipetic-Grujicic S, Markovic Denic L et al. The burden of disease and injury in Serbia. *Eur J Public Health* 2007; 17: 80-5.
77. Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000. 21: 387-385.
78. Corman M. Colon and rectal surgery. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1993.
79. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. Philadelphia (PA): Elsevier Saunders; 2010. pp. 826-827.
80. Compton C: Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig—this* 1999;17:67-79.
81. Ioannou GN, Rockey DC, Bryson CL, Weiss NS. Iron deficiency and gastrointestinal malignancy: a population-based cohort study. *Am J Med* 2002; 113: 275-80.
82. Jonsson PE, Bengtsson G, Carlsson G, Jonson G, Truding N. Value of serum 5-nucleotidase, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transferase for prediction of liver metastases preoperatively in colorectal cancer. *Acta Chir Scand* 1984; 150: 419-23.
83. Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bact* 1932;35:323-332.
84. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139:846.
85. Cunningham J, Kantekure K, Saif MW. Medullary carcinoma of the colon: a case series and literature review. *In Vivo*. 2014;28(3):311-4.
86. Ong ML, Schofield JB. Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World J Gastrointest Surg*. 2016;8(3):179-92.
87. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2016;6:29765.
88. Hugen N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Histological subtypes strongly influence the metastatic pattern in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(3):651- 7.
89. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15065.

90. Sobin LH. TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol.* 2003;21(1):19-22.
91. Gleisner AL, Mogal H, Dodson R, Efron J, Gearhart S, Wick E, Lidor A, Herman JM, Pawlik TM. Nodal status, number of lymph nodes examined, and lymph node ratio: what defines prognosis after resection of colon adenocarcinoma? *J Am Coll Surg.* 2013;217(6):1090-100.
92. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003;16(4):376-88.
93. Lynch ML, Brand MI. Preoperative evaluation and oncologic principles of colon cancer surgery. *Clin Colon Rectal Surg.* 2005;18(3):163-73.
94. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014;383(9927):1490-502.
95. Akkoca AN, Yanik S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, et al. TNM and Modified Dukes staging and the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(9):2828-35.
96. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153-73.
97. Hsu YL, Lin CC, Jiang JK, Lin HH, Lan YT, Wang HS, Yang SH, Chen WS, Lin TC, Lin JK, Lin PC, Chang SC. Clinicopathological and molecular differences in colorectal cancer according to location. *Int J Biol Markers.* 2019;34(1):47-53.
98. Arena EA, Bilchik AJ. What is the optimal means of staging colon cancer? *Adv Surg.* 2013;47:199-211.
99. Coll AR. Dukes' staging is poorly understood by doctors managing colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl.* 2003;85(6):444.
100. Niederhuber JE, Cole CE, Grochow L, Jacoby RF, Lee FT, Moony M, Ritter M: Colon Cancer. In: Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG (eds): *Clinical Oncology* 3th, Elsevier, Churchill Livingstone, 2004, pp1871- 1877.
101. Stojanovic M, Radojkovic M, Jeremic LJ, Stanojevic G: Optimalno vreme za hirursko lecenje metastaza kolorektalnog karcinoma u jetri. U: Krivokapić Z (ed): *Karcinom rektuma*. Zavod za udžbenike, Beograd, 2012, pp409-418 .
102. Weiser MR, Garsia-Aguilar J, Yeo CJ: Basic Principles of the Operative Treatment of Colorectal Cancer. In: Yeo CJ (ed): *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, Elsevier, 8th edition, 2019, pp.1981-1991.
103. Huang YX, Lin YZ, Li JL, Zhang XQ, Tang LR, Zhuang QY, Lin FF, Lin XJ, Wu JX. Role of postoperative radiotherapy in pT3N0 rectal cancer: A risk-stratification system based on population analyses. *Cancer Med.* 2019 Mar; 8(3):1024-1033.
104. James A. Martenson Jr., Michael G. Haddock, and Leonard L. Gunderson. Cancers of the Colon, Rectum, and Anus. In: Levitt SH, J. A. Purdy JA, Perez CA, Vijayakumar S (Eds.): *Technical Basis of Radiation Therapy* (4th ed). Springer, 2006, pp545-561.
105. Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019; 17(5.5):599-601.

106. <sup>3</sup>Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol.* 2012; 34(3):192-9.
107. Schmoll HJ, Twelves C, Sun W, et al. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III colon cancer and the effect of oxaliplatin on post-relapse survival: a pooled analysis of individual patient data from four randomized controlled trials. *Lancet Oncol.* 2014; 15(13):1481-92.
108. Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, et al. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol.* 2016; 29(1):18-23.
109. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije: Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma, Milašinović G. (ur). Izdavač: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije. 2013.
110. <sup>2</sup>Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol.* 2016;8(1):57-84.
111. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;59(2):159-68.
112. <sup>2</sup>Riddell IA. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci.* 2018;18.
113. Soldatović T. Uticaj supstitucionih reakcija kompleksa platine(II) sa biomolekulima na njihovu citotoksičnost. Novi Sad: Matica Srpska; 2014. p. 25-32.
114. <sup>2</sup>Makovec T. Cisplatin and beyond molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):148-58.
115. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy - an update from a drug design perspective. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:599-616.
116. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010;39(35):8113-27.
117. <sup>2</sup>Boal AK, Rosenzweig AC. Crystal structures of cisplatin bound to a human copper chaperone. *J Am Chem Soc.* 2009;131(40):14196-7.
118. <sup>2</sup>Mehmood RK. Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncol Rev.* 2014;8(2):256.
119. <sup>2</sup>Tsvetkova D, Ivanova S. Application of Approved Cisplatin Derivatives in Combination Therapy against Different Cancer Diseases. *Molecules.* 2022;27(8).
120. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther.* 2019;11(4).
121. <sup>2</sup>Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
122. <sup>2</sup>Vermorken JB, ten Bokkel Huinink WW, Eisenhauer EA, Favalli G, Belpomme D, Conte PF, et al. Advanced ovarian cancer. Carboplatin versus cisplatin. *Ann Oncol.* 1993;4 Suppl 4:41-8.



123. Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol.* 1998;9(1):13-21.
124. Fox LE. Carboplatin. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;36(1):13-4.
125. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev.* 2016;116(5):3436-86.
126. Wu Y, Xu XY, Yan F, Sun WL, Zhang Y, Liu DL, et al. Retrospective study of the efficacy and toxicity of lobaplatin in combined chemotherapy for metastatic breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4849-57.
127. Kuwahara A, Yamamori M, Nishiguchi K, Okuno T, Chayahara N, Miki I, et al. Replacement of cisplatin with nedaplatin in a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.* 2009;6(6):305-11.
128. Min YJ, Bang SJ, Shin JW, Kim DH, Park JH, Kim GY, et al. Combination chemotherapy with 5-fluorouracil and heptaplatin as first-line treatment in patients with advanced gastric cancer. *J Korean Med Sci.* 2004;19(3):369-73.
129. Cunningham D, Sirohi B, Pluzanska A, Utracka-Hutka B, Zaluski J, Glynne-Jones R, et al. Two different first-line 5-fluorouracil regimens with or without oxaliplatin in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2009; 20(2): 244-50.
130. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol.* 1998;9(10):1053-71.
131. Karabacak K, Kadan M, Kaya E, Durgun B, Arslan G, Doganci S, et al. Oxaliplatin Induced Digital Ischemia and Necrosis. *Case Rep Vasc Med.* 2015;2015:248748.
132. Viator NO, George BJ. Oxaliplatin-induced hepatocellular injury and ototoxicity: a review of the literature and report of unusual side effects of a commonly used chemotherapeutic agent. *J Oncol Pharm Pract.* 2012;18(3):355-9.
133. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance, and induced side effects. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1351-71.
134. Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf.* 2009;32(12):1109-22.
135. Brouwers EE, Huitema AD, Beijnen JH, Schellens JH. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clin Pharmacol.* 2008;8:7.
136. Sheth S, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Otoprotection. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:338.
137. Paken J, Govender CD, Pillay M, Sewram V. A Review of Cisplatin-Associated Ototoxicity. *Semin Hear.* 2019;40(2):108-21.
138. Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology.* 2016;371:58-66.
139. Michel L, Rassaf T, Totzeck M. Biomarkers for the detection of apparent and subclinical cancer therapy-related cardiotoxicity. *J Thorac Dis.* 2018;10(Suppl 35):S4282- s95.

140. Ma W, Wei S, Zhang B, Li W. Molecular Mechanisms of Cardiomyocyte Death in Drug-Induced Cardiotoxicity. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:434.
141. Hu Y, Sun B, Zhao B, Mei D, Gu Q, Tian Z. Cisplatin-induced cardiotoxicity with midrange ejection fraction: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(52):e13807.
142. Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol.* 2008;28(3):337-44.
143. Shahid F, Farooqui Z, Khan F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *Eur J Pharmacol.* 2018;827:49-57.
144. Pratibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;532(3):290-3.
145. El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, FePHKndo A, et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):466-73.
146. Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, et al. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press.* 2014;12(2):55-65.
147. Fu Y, Cai J, Li F, Liu Z, Shu S, Wang Y, et al. Chronic effects of repeated low-dose cisplatin treatment in mouse kidneys and renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019;317(6):F1582-f92.
148. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2010;2(11):2490-518.
149. Filipinski KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH, Sparreboom A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(4):396-402.
150. Abd Rashid N, Abd Halim SAS, Teoh SL, Budin SB, Hussan F, Adib Ridzuan NR, et al. The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2021;144:112328.
151. McSweeney KR, Gadanec LK, Qaradakhi T, Ali BA, Zulli A, Apostolopoulos V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations. *Cancers (Basel).* 2021;13(7).
152. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
153. Nanji AA, Stewart DJ, Mikhael NZ. Hyperuricemia and hypoalbuminemia predispose to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;17(3):274-6.
154. Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury, Mechanisms of induction and implication for therapy. *Curr Cancer Ther Rev.* 2006;2(3):271-9.



155. Benoit L, Mir O, Vialard F, Berveiller P. Cancer during Pregnancy: A Review of Preclinical and Clinical Transplacental Transfer of Anticancer Agents. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6).  
3
156. Vasić LJ: Značaj neoadjuvantnog pristupa u lečenju lokalno uznapredovalog carcinoma rektuma. *Biomedicinska Istraživanja*; 2018, 9(1):83-91.  
3
157. Nilsson PJ, Etten BV, Hospers GA, Pålman L, Velde CJVD, Beets-Tan RG. et al. Shortcourse radiotherapy followed by neo-adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer - the 188 RAPIDO trial. *Bmc Cancer*. 2013; 13:1–9.  
3
158. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brow G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28(suppl 4):iv22–iv40.
159. Li Y, Wang J, Ma X, Tan L, Yan Y, Xue C, Hui B, Liu R, Ma H, Ren J. A Review of Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Biol Sci*. 2016 Jul 17; 12(8):1022-31.
160. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, et al. Tumor regression graramu after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal carcinoma revisited: updated results of the CAO/ARO/AIO-94 trial. *J Clin Oncol*. 2014; 32:1554–62
161. Zheng J, Feng X, Hu W, Wang J, Li Y. Systematic review and meta-analysis of preoperative chemoradiotherapy with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(13):e6487.  
3
162. Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med*, 1971, 285(21):1182–1186  
3
164. Papa A, Zaccarelli E, Caruso D, Vici P, Benedetti Panici P, Tomao F. Targeting angiogenesis in endometrial cancer - new agents for tailored treatments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016; 25(1):31-49.  
3
164. Patel J.N., Fong M.K., Jagosky M. Colorectal cancer biomarkers in the era of personalized medicine. *J. Pers. Med*. 2019; 9:3.  
1
165. Jaganyi, D.; Hofmann, A.; van Eldik, R. Controlling the Lability of Square-Planar PtII Complexes through Electronic Communication between  $\pi$ -Acceptor Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2001, 40, 1680–1683.
166. Hofmann, A.; Jaganyi, D.; Munro, O.Q.; Liehr, G.; van Eldik, R. Electronic Tuning of the Lability of Pt(II) Complexes through  $\pi$ -Acceptor Effects. Correlations between Thermodynamic, Kinetic, and Theoretical Parameters. *Inorg. Chem*. 2003, 42, 1688–1700.
167. Reddy, D.; Jaganyi, D. Influence of the Bridging Azine Ligand on the Rate of Ligand Substitution in a Series of Dinuclear Platinum(II) Complexes. *Int. J. Chem. Kinet*. 2011, 43, 161–174.
168. Appleton, T.G.; Bailey, A.J.; Barnham, K.J.; Hall, J.R. Aspects of the Solution Chemistry of Trans-Diammineplatinum(II) Complexes. *Inorg. Chem*. 1992, 31, 3077–3082.
169. Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P.J.; Brabec, V. DNA Interactions of Monofunctional Organometallic Ruthenium(II) Antitumor Complexes in Cell-free Media. *Biochemistry* 2003, 42, 11544–11554.

170. Rizvi, M.A.; Zaki, M.; Afzal, M.; Mane, M.; Kumar, M.; Shah, B.A.; Srivastav, S.; Srikrishna, S.; Peerzada, G.M.; Tabassum, S. Nuclear blebbing of biologically active organoselenium compound towards human cervical cancer cell (HeLa): In vitro DNA/HSA binding, cleavage and cell imaging studies. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 90, 876–888.
171. Petrović, A.; Milutinović, M.M.; Petri, E.T.; Živanović, M.; Milivojević, N.; Puchta, R.; Scheurer, A.; Korzekwa, J.; Klisurić, O.R.; Bogojeski, J. Synthesis of Camphor-Derived Bis(pyrazolylpyridine) Rhodium(III) Complexes: Structure–Reactivity Relationships and Biological Activity. *Inorg. Chem.* 2018, 58, 307–319.
172. Milutinović, M.M.; Bogojeski, J.V.; Klisurić, O.; Scheurer, A.; Elmroth, S.K.C.; Bugarčić, D. Synthesis and structures of a pincer-type rhodium(iii) complex: Reactivity toward biomolecules. *Dalton Trans.* 2016, 45, 15481–15491.
173. Petrović, A.Z.; Ćočić, D.C.; Bockfeld, D.; Živanović, M.; Milivojević, N.; Virjević, K.; Janković, N.; Scheurer, A.; Vraneš, M.; Bogojeski, J.V. Biological Activity of Bis(Pyrazolylpyridine) and Terpyridine Os(II) Complexes in the Presence of Biocompatible Ionic Liquids. *Inorg. Chem. Front.* 2021, 8, 2749–2770.
174. Kelly, J.; Tossi, A.; McConnell, D.J.; Ohuigin, C. A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 6017–6034.
175. Boger, D.L.; Fink, B.E.; Brunette, S.R.; Tse, W.C.; Hedrick, M.P. A Simple, High-Resolution Method for Establishing DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 5878–5891.
176. Dimiza, F.; Papadopoulos, A.N.; Tangoulis, V.; Psycharis, V.; Raptopoulou, C.P.; Kessissoglou, D.P.; Psomas, G. Biological evaluation of non-steroidal anti-inflammatory drugs-cobalt(ii) complexes. *Dalton Trans.* 2010, 39, 4517–4528.
177. Ćočić, D.; Jovanović-Stević, S.; Jelić, R.; Matić, S.; Popović, S.; Djurdjević, P.; Baskić, D.; Petrović, B. Homo- and hetero-dinuclear Pt(II)/Pd(II) complexes: studies of hydrolysis, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, DFT calculations, molecular docking and cytotoxic activity. *Dalton Trans.* 2020, 49, 14411–14431.
178. Zhang, S.; Lei, W.; Xia, M.; Wang, F. QSAR study on N-containing corrosion inhibitors: Quantum chemical approach assisted by topological index. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 2005, 732, 173–182.
179. Lashgari, M.; Arshadi, M.R.; Parsafar, G.A. A Simple and Fast Method for Comparison of Corrosion Inhibition Powers between Pairs of Pyridine Derivative Molecules. *Corrosion* 2005, 61, 778–783.
180. Dassault Systèmes. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualize, version 17.2.0; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2016.
181. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A.; et al. Gaussian 09, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2013.
182. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009, 30, 2785–2791.

183. Schrodinger, L.L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version XXC; Schrodinger, Inc.: New York, NY, USA, 2010.
184. Sanner, M.F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 1999, 17, 57–61.
185. Nafisi, S.; Norouzi, Z. A Comparative Study on the Interaction of Cis- and Trans-Platin with DNA and RNA. *DNA Cell Biol.* 2009, 28, 469–477.
186. Karthikeyan, S.; Velmurugan, D.; Aruna, P.R.; Ganesan, S.-v.; Tamilkumar, P.; Bharanidharan, G. Binding studies of cisplatin with human serum albumin. *Trends Biomater. Artif. Organs* 2015, 29, 273–278.
187. Dimiza, F.; Perdihi, F.; Tangoulis, V.; Turel, I.; Kessissoglou, D.P.; Psomas, G. Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: Synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *J. Inorg. Biochem.* 2011, 105, 476–489.
188. Rippe, K. Analysis of protein-DNA binding at equilibrium B. I. F. Futura 1997, 12, 20–26.
189. Senthil Raja, D.; Bhuvanesh, N.S.P.; Natarajan, K. Effect of N(4)-Phenyl Substitution in 2-Oxo-1,2-Dihydroquinoline-3-Carbaldehyde Semicarbazones on the Structure, DNA/Protein Interaction, and Antioxidative and Cytotoxic Activity of Cu(II) Complexes. *Inorg. Chem.* 2011, 50, 12852–12866.
190. Stojanović, S.D.; Janković, S.M.; Matović, Z.D.; Jakovljević, I.Z.; Jelić, R.M. Interaction between tigecycline and human serum albumin in aqueous solution. *Monatsh Chem.* 2015, 146, 399–409.
191. Soldatović, T.V.; Šmit, B.; Mrkalić, E.M.; Matić, S.L.; Jelić, R.M.; Serafinović, M.Ć.; Gligorijević, N.; Čavić, M.; Arandelović, S.; Grgurić-Šipka, S. Exploring Heterometallic Bridged Pt(II)-Zn(II) Complexes as Potential Antitumor Agents. *J. Inorg. Biochem.* 2023, 240, 112100.
192. Kolenović Serezlić, M.; Hasić, R.; Ašanin, D.; Šmit, B.; Matić, S.L.; Čendić Serafinović, M.; Nikodijević, D.; Jovanki', Č.J.; Grgurić-Šipka, S.; Soldatović, T.V. Heterometallic bridged Pt(II)-Zn(II) complexes: influence of the substituent in 4'-position in inert terpy ligand on antigenotoxicity, potential antitumor activity and mechanism of interactions of the complexes with biomolecules, *Appl. Organomet. Chem.* 2024, e7413.
193. 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, 286.
194. Jan, R.; Chaudhry, G.-E. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.* 2019, 9, 205–218.
195. Qian, S.; Wei, Z.; Yang, W.; Huang, J.; Yang, Y.; Wang, J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front. Oncol.* 2022, 12, 985363.
196. Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018, 25, 65–80.

197. <sup>1</sup> Alam, M.; Ali, S.; Mohammad, T.; Hasan, G.M.; Yadav, D.K.; Hassan, I. B Cell Lymphoma 2: A Potential Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10442.
198. McIlwain, D.R.; Berger, T.; Mak, T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5, a008656.
199. <sup>1</sup> Miller, I.; Min, M.; Yang, C.; Tian, C.; Gookin, S.; Carter, D.; Spencer, S.L. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep.* 2018, 24, 1105–1112.e5.
200. Li, L.T.; Jiang, G.; Chen, Q.; Zheng, J.N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* 2015, 11, 1566–1572.
201. Ding, L.; Cao, J.; Lin, W.; Chen, H.; Xiong, X.; Ao, H.; Yu, M.; Lin, J.; Cui, Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1960.
202. Bertoli, C.; Skotheim, J.M.; de Bruin, R.A.M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, 14, 518–528.
203. <sup>1</sup> Topacio, B.R.; Zatulovskiy, E.; Cristea, S.; Xie, S.; Tambo, C.S.; Rubin, S.M.; Sage, J.; Kõivomägi, M.; Skotheim, J.M. Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix. *Mol. Cell* 2019, 74, 758–770.e4.
204. <sup>1</sup> Fagundes, R.; Teixeira, L.K. Cyclin E/CDK2: DNA Replication, Replication Stress and Genomic Instability. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 774845.
205. <sup>1</sup> Ramu, V.; Gill, M.R.; Jarman, P.J.; Turton, D.; Thomas, J.A.; Das, A.; Smythe, C. A Cytostatic Ruthenium(II)–Platinum(II) Bis(terpyridyl) Anticancer Complex That Blocks Entry into S Phase by Up-regulating p27<sup>KIP1</sup>. *Chem.—A Eur. J.* 2015, 21, 9185–9197.
206. <sup>1</sup> Al Bitar, S.; Gali-Muhtasib, H. The Role of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p21<sup>cip1/waf1</sup> in Targeting Cancer: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutics. *Cancers* 2019, 11, 1475.
207. <sup>1</sup> Ma, L.; Li, L.; Zhu, G. Platinum-containing heterometallic complexes in cancer therapy: Advances and perspectives. *Inorg. Chem. Front.* 2022, 9, 2424–2453.
208. Giorgi, E.; Binacchi, F.; Marotta, C.; Cirri, D.; Gabbiani, C.; Pratesi, A. Highlights of New Strategies to Increase the Efficacy of Transition Metal Complexes for Cancer Treatments. *Molecules* 2022, 28, 273.
209. <sup>1</sup> Lippert, B. *Cisplatin Chemistry and Biochemistry of Leading Anticancer Drugs*; Wiley-VCH: Zürich, Switzerland, 1999.
210. Wang, D.; Lippard, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 307–320.



211. <sup>1</sup> Van Zutphen, S.; Reedijk, J. Targeting Platinum Anti-Tumour Drugs: Overview of Strategies Employed to Reduce Systemic Toxicity. *Coord. Chem. Rev.* 2005, 249, 2845–2853.
212. Zorbas, H.; Keppler, B.K. Cisplatin Damage: Are DNA Repair Proteins Saviors or Traitors to the Cell? *ChemBioChem* 2005, 6, 1157–1166.
213. Bertini, I.; Gray, H.B.; Stiefel, E.I.; Valentine, J.S. (Eds.) *Biological Inorganic Chemistry. Structure and Reactivity*; University Science Books: Sausalito, CA, USA, 2007.
214. Soldatović, T.V.; Selimović, E.; Šmit, B.; Ašanin, D.; Planojević, N.S.; Marković, S.D.; Puchta, R.; Alzoubi, B.M. Interactions of zinc(II) complexes with 5'-GMP and their cytotoxic activity. *J. Coord. Chem.* 2019, 72, 690–706.
215. Soldatović, T.V. *Application of the Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Mechanisms of Bioinorganic Reaction*; Livre de Lyon Publisher: Lyon, France, 2019.
216. Soldatović, T.V.; Selimović, E.; Milivojević, N.; Jovanović, M.; Šmit, B. Novel heteronuclear Pt (II)-L-Zn (II) complexes: Synthesis, interactions with biomolecules, cytotoxic properties. Two metals give promising antitumor activity? *Appl. Organomet. Chem.* 2020, 34, e5864.
217. <sup>1</sup> Wenzel, M.; Bigaeva, E.; Richard, P.; Le Gendre, P.; Picquet, M.; Casini, A.; Bodio, E. New heteronuclear gold(I)-platinum(II) complexes with cytotoxic properties: Are two metals better than one? *J. Inorg. Biochem.* 2014, 141, 10–16.
218. Ma, X.; Lu, J.; Yang, P.; Huang, B.; Li, R.; Ye, R. Synthesis, Characterization and Antitumor Mechanism Investigation of Heterometallic Ru(II)-Re(I) Complexes. *Front. Chem.* 2022, 10, 890925.
219. Ma, D.-L.; Wu, C.; Cheng, S.-S.; Lee, F.-W.; Han, Q.-B.; Leung, C.-H. Development of Natural Product-Conjugated Metal Complexes as Cancer Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 341.
220. <sup>1</sup> Ma, D.-L.; Ma, R.; Wang, Z.; Yiu, S.-M.; Zhu, G. Heterodinuclear Pt(IV)-Ru(II) Anticancer Prodrugs to Combat Both Drug Resistance and Tumor Metastasis. *ChemComm* 2016, 52, 10735–10738.
221. <sup>1</sup> Geary, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Co-ord. Chem. Rev.* 1971, 7, 81–122.
222. <sup>1</sup> Jurisevic, M.; Arsenijevic, A.; Pantic, J.; Gajovic, N.; Milovanovic, J.; Milovanovic, M.; Poljarevic, J.; Sabo, T.; Vojvodic, D.; Radosavljevic, G.D.; et al. The organic ester *O,O'*-diethyl-(*S,S'*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget* 2018, 9, 28195–28212.
223. Popović, A.; Nikolić, M.; Mijajlović, M.; Ratković, Z.; Jevtić, V.; Trifunović, S.R.; Radić, G.; Zarić, M.; Canović, P.; Milovanović, M.; et al. DNA binding and antitumor activities of zinc(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit. Met. Chem.* 2019, 44, 219–228.

224. <sup>1</sup> Li, J.; Liu, R.; Jiang, J.; Liang, X.; Huang, L.; Huang, G.; Chen, H.; Pan, L.; Ma, Z. Zinc(II) Terpyridine Complexes: Substituent Effect on Photoluminescence, Antiproliferative Activity, and DNA Interaction. *Molecules* 2019, 24, 4519.
225. Li, C.; Xu, F.; Zhao, Y.; Zheng, W.; Zeng, W.; Luo, Q.; Wang, Z.; Wu, K.; Du, J.; Wang, F. Platinum(II) Terpyridine Anticancer Complexes Possessing Multiple Mode of DNA Interaction and EGFR Inhibiting Activity. *Front. Chem.* 2020, 8, 210.
226. <sup>1</sup> Konovalov, B.; Franich, A.A.; Jovanović, M.; Jurisević, M.; Gajović, N.; Arsenijević, N.; Maric, V.; Jovanović, I.; Živković, M.D.; Rajković, S. Synthesis, DNA-/bovine serum albumin-binding affinity, and cytotoxicity of dinuclear platinum(II) complexes with 1,6-naphthyridine-bridging ligand. *Appl. Organomet. Chem.* 2021, 35, e6112.
227. <sup>7</sup> Lockshaine, RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 2004, 23(16), 2766-73.
228. <sup>7</sup> Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008; 27(50): 6398- 40.
229. <sup>7</sup> Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB et al. Multiple bcl-2 family members demonstrate selective dimerisation with bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17): 7834-8.
230. <sup>7</sup> Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4(6): 327- 32.
231. <sup>7</sup> Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, et al. tBID homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(14): 12237–45.
232. <sup>7</sup> Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013;12:86.
233. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012, 26:203-34.
234. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavalaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug –induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 2000; 7(1): 102-11.
235. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1): 57-70.
236. Dorjgochoo T, Xiang YB, Long J, Shi J, Deming S, Xu WH, Cai H, et al. Association of Genetic Markers in the BCL-2 Family of Apoptosis-Related Genes with Endometrial Cancer Risk in a Chinese Population. *PLOS one* 2013; 8(4): e60915.
237. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated



mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8(3): 705-11.

<sup>1</sup> 238. Qin, Q.-P.; Wang, Z.-F.; Wang, S.-L.; Luo, D.-M.; Zou, B.-Q.; Yao, P.-F.; Tan, M.-X.; Liang, H. In vitro and in vivo antitumor activities of three novel binuclear platinum(II) complexes with 4'-substituted-2,2':6',2''-terpyridine ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 170, 195–202.

<sup>1</sup> 239. Liu, D.; Zhang, M.; Du, W.; Hu, L.; Li, F.; Tian, X.; Wang, A.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Wu, J.; et al. A Series of Zn(II) Terpyridine-Based Nitrate Complexes as Two-Photon Fluorescent Probe for Identifying Apoptotic and Living Cells via Subcellular Immigration. *Inorg. Chem.* 2018, 57, 7676–7683.

<sup>8</sup> 240. Lazic D, Arsenijevic A, Puchta R, Bugarcic ZD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(ii) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016;45(11):4633-4646.

241. Milutinovic MM, Rilak A, Bratsos I, Klisuric O, Vranes M, Nevenka G, et al. New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. *J Inorg Biochem.* 2017;169:1-12.

<sup>3</sup> 242. Bruno S, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z. Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry.* 1992;13(5):496-501.

243. Bridger JM, Kill IR, Lichter P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res.* 1998;6(1):13-24.

244. Sra KK, Torres G, Rady P, Hughes TK, Payne DA, Tyring SK. Molecular diagnosis of infectious diseases in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 53(5):749-65.

245. Foltyn W, Zajęcki W, Marek B, Kajdaniuk D, Siemińska L, Zemczak A, Kos-Kudła B. The value of the Ki-67 proliferation marker as a prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endokrynol Pol.* 2012;63(5):362-6.

246. Healy E, Angus B, Lawrence CM, Rees JL. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1995;133(5):737-41

<sup>3</sup> 247. Habberstad AH, Gulati S, Torp SH. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase II $\alpha$  in human anaplastic astrocytomas--an immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* 2011; 24;6:43-8.

<sup>3</sup> 248. Gerlach C, Golding M, Larue L, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest.* 1997;77(6):697-8.

<sup>3</sup> 249. Robert A. Weinberg. *The Biology of Cancer*. Second edition. Garland Science. 2016.

250. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl).* 2016 Dec;94(12):1313–1326.

251. Lengare PV, Sinai Khandeparkar SG, Joshi AR, Gogate BP, Solanke SG, Gore SH.

Immunohistochemical expression of cyclin D1 in invasive breast carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Indian J Pathol Microbiol.* 2020 Jul-Sep;63(3):376–381.

252. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, Pestell RG, Hinds PW, Dowdy SF, Brown M, Ewen ME. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5338–5347.

<sup>3</sup>  
253. Myklebust MP, Li Z, Tran TH, Rui H, Knudsen ES, Elsaleh H, Fluge Ø, Vonen B, Myrvold HE, Leh S, Tveit KM, Pestell RG, Dahl O. Expression of cyclin D1a and D1b as predictive factors for treatment response in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2012 Nov 6;107(10):1684–91.

254. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res.* 2009;15, 4431–8.

255. Albasri AM, Elkablawy MA, Ansari IA, Alhujaily AS. Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer: An Experience from Madinah, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Aug 1;20(8):2471–2476.

256. Wangefjord S, Manjer J, Gaber A, Nodin B, Eberhard J, Jirström K. Cyclin D1 expression in colorectal cancer is a favorable prognostic factor in men but not in women in a prospective, population-based cohort study. *Biol Sex Differ.* 2011; 2: 10.

257. Li Y, Wei J, Xu C, Zhao Z, You T. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One.* 2014;9(4):e94508.

<sup>8</sup>  
258. Huang HL, Li ZZ, Liang ZH, Yao JH, Liu YJ. Synthesis, cellular uptake, apoptosis, cytotoxicity, cell cycle arrest, interaction with DNA and antioxidant activity of ruthenium(II) complexes. *Eur J Med Chem.* 2011;46(8):3282–3290.

<sup>8</sup>  
259. Dabiri Y, Schmid A, Theobald J, Blagojevic B, Streciwilk W, Ott I, et al. A Ruthenium(II) N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complex with Naphthalimide Ligand Triggers Apoptosis in Colorectal Cancer Cells via Activating the ROS-p38 MAPK Pathway. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3964.

260. Lima AP, Pereira FC, Almeida MA, et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *PloS One.* 2014;9(10):e105865.



### **БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА**

Самир Вучељ, рођен 12. децембра 1982. године у Рватска, Лепосавић, Република Србија, истакао се одличним успехом у основној и средњој школи у Новом Пазару. Наставио је образовање на Факултету медицинских наука Универзитета у Београду, где је уписан 2001. године. Дипломирао је 2007. године са просечном оценом 9,11 и стекао назив доктора медицине. Од 2008. године запослен је у Општој болници у Новом Пазару, на одељењу интерне медицине. Специјализацију из интерне медицине започео је 2013. године на Медицинском факултету Универзитета у Београду, завршио са одличном оценом 2018. год. Ужу специјализацију из гастроентерохепатологије уписао 2020. год. завршио 2021. год. са оценом десет. Такође, уписао је докторске академске студије 2011. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје: Интерна медицина. Усмени део докторског испита положио је 2023. године са оценом десет. Аутор је и коаутор више радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом. Познаје рад на рачунарима (Word, Excel, PowerPoint, SPSS) и говори енглески језик.

## Образац 1

Образац 1

### ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Нови хетеронуклеарни  $Pt(II)$ - $L$ - $Zn(II)$  комплекси: испитивање антитуморске активности на ћелијама колоректалног карцинома, *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, 10.10.2024. године,

Саша Вукот.  
потпис аутора

Образац 2

Образац 2

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

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

\_\_\_\_ Нови хетеронуклеарни Pt(II)-L-Zn(II) комплекси: испитивање антитуморске  
активности на ћелијама колоректалног карцинома, in vitro

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

истоветне.

У Крагујевцу, 10.10.2024. године,

Саша Вукотић  
потпис аутора



### Образац 3

Образац 3

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Самир Вучељ,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

Нови хетеронуклеарни Pt(II)-L-Zn(II) комплекси: испитивање  
антитуморске активности на ћелијама колоректалног карцинома, 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 дозвољавам<sup>1</sup>

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 10.10.2024. године,

Саша Вукан  
потпис аутора

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





# Нови хетеронуклеарни Pt(II)-L-Zn(II) комплекси: испитивање антитуморске активности на ћелијама колоректалног карцинома, in vitro

ORIGINALITY REPORT

24%

SIMILARITY INDEX

## PRIMARY SOURCES

|   |                                                                        |                 |
|---|------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1 | <a href="http://phaidrabg.bg.ac.rs">phaidrabg.bg.ac.rs</a><br>Internet | 3108 words — 9% |
| 2 | <a href="http://fedorakg.kg.ac.rs">fedorakg.kg.ac.rs</a><br>Internet   | 2030 words — 6% |
| 3 | <a href="http://nardus.mpn.gov.rs">nardus.mpn.gov.rs</a><br>Internet   | 1979 words — 6% |
| 4 | <a href="http://ouci.dntb.gov.ua">ouci.dntb.gov.ua</a><br>Internet     | 349 words — 1%  |
| 5 | <a href="http://eteze.bg.ac.rs">eteze.bg.ac.rs</a><br>Internet         | 343 words — 1%  |
| 6 | <a href="http://fedorabg.bg.ac.rs">fedorabg.bg.ac.rs</a><br>Internet   | 321 words — 1%  |
| 7 | <a href="http://fedorani.ni.ac.rs">fedorani.ni.ac.rs</a><br>Internet   | 303 words — 1%  |
| 8 | <a href="http://www.medf.kg.ac.rs">www.medf.kg.ac.rs</a><br>Internet   | 263 words — 1%  |

EXCLUDE QUOTES            OFF  
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY   OFF

EXCLUDE SOURCES           < 1%  
EXCLUDE MATCHES           < 9 WORDS