



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Дамњан Н. Пантић

**Испитивање цитотоксичности
новосинтетисаних комплекса паладијума(II)
са Шифовим базама изведеним од салицил-
алдехида на ћелије карцинома простате in
vitro**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Damnjan N. Pantić

**Ispitivanje citotoksičnosti novosintetisanih
kompleksa paladijuma(II) sa Šifovim bazama
izvedenim od salicil-aldehida na ćelije
karcinoma prostate in vitro**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2026.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Damnjan N. Pantić

**Investigation of the cytotoxicity of newly
synthesized complexes of palladium(II) with
Schiff bases derived from salicyl-aldehyde on
prostate cancer cells in vitro**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2026.

Аутор
Име и презиме: Дамњан Н. Пантић
Датум и место рођења: 27.05.1978. Крагујевац
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Хирургија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу; Специјалиста урологије, УКЦ Крагујевац
Докторска дисертација
Наслов: Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) са Шифовим базама изведеним од салицил-алдехида на ћелије карцинома простате in vitro
Број страница: 83
Број слика: 22 (13 графикана, 3 табеле, 6 слика)
Број библиографских података: 161
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: Проф. др Петар Чановић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска биохемија
Датум пријаве теме:
30.10.2024.
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:
Број: IV-03-68/16 Датум: 19.02.2025.

Autor
Ime i prezime: Damnjan N. Pantić
Datum i mesto rođenja: 27.05.1978. Kragujevac
Sadašnje zaposlenje: asistent za užu naučnu oblast Hirurgija, Fakultet medicinskih nauka Univerzitet u Kragujevcu, specijalista urologije, UKC Kragujevac
Doktorska disertacija
Naslov: Ispitivanje citotoksičnosti novosintetisanih kompleksa paladijuma(II) sa Šifovim bazama izvedenim od salicil-aldehida na ćelije karcinoma prostate in vitro
Broj stranica: 83
Broj slika: 22 (grafikona 13, tabela 3, slika 6)
Broj bibliografskih podataka: 161
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke
Mentor: prof. dr Petar Čanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Medicinska Biohemija
Datum prijave teme: 30.10.2024.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-68/16 datum: 19.02.2025.

Author
Name and surname: Damnjan N. Pantić
Date and place of birth: 27.05.1978. Kragujevac
Current employment: Teaching assistant in Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Urology specialist, University Clinical Center Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Investigation of the cytotoxicity of newly synthesized complexes of palladium(II) with Schiff bases derived from salicyl-aldehyde on prostate cancer cells in vitro
No. of pages: 83
No. of images: 22 (13 charts, 3 tables, 6 images)
No. of bibliographic data: 161
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medical Sciences
Mentor: Petar Čanović, MD PhD, Associate Professor at the Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Topic Application Date:
30.10.2024.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
Decision number: IV-03-68/16; Date: 19.02.2025.

ЗАХВАЛНИЦА

Мојој мајци, мојој супрузи Катарини , а изнад свега мојој деци , Богдану и Магдалени

„ Човек не може бирати време у коме ће се родити и радити , али може да бира хоће ли бити човек . ”

Иво Андрић

Велику захвалност дугујем свом ментору , проф.др Петру Чановићу , мајстору науке , на несебичној помоћи, моралној подрици и правим смерницама у изради докторске дисертације.

Захвалност дугујем проф.др Милану Зарићу , научном ауторитету , на залагању и брилијантним идејама које су помогле да превазиђем сва ограничења у изради ове дисертације

САЖЕТАК

Као прелазни метал паладијум има могућност да гради комплексна једињења, стога, синтетисан је велики број комплекса паладијума са различитим лигандима, а све у циљу испитивања антитуморског ефекта као и селективности потенцијалних хемиотерапеутика. Оваква једињења су показала веома снажан антипролиферативни ефекат на различите канцерске ћелије.

Стога циљ наше студије је дефинисање антипролиферативног дејства три синтетисана $Pd(II)$ комплекса која смо обележили као $Pd1(C_{28}H_{24}N_2O_4Pd)$, $Pd2(C_{30}H_{28}N_2O_4Pd)$ и $Pd3(C_{34}H_{30}N_4O_2Pd)$ на ћелије *DU-145*- и *PC-3* (ћелијске линије карцинома простате). Методе коришћене у нашој студији су *MTT* тест, апоптотски тест, детекција ћелијске деобе применом *PI* бојења и анализа регулаторних молекула унутрашњег митохондријалног пута.

Систематском анализом података студија је доказала да сва три $Pd(II)$ једињења поседују снажан антипролиферативни ефекат на малигне ћелије простате. Са друге стране, наведена једињења показују веома слаб антипролиферативни ефекат на фибробласте. Смањење вијабилности тестираних канцерских ћелија од стране $Pd(II)$ комплекса је условљено индукцијом ране апоптозе. Осим тога, тестирана једињења доводе и до застоја у ћелијском циклусу. Апоптоза је активирана митохондријалним путем при чему се унутар ћелије мења однос *Bax/Bcl-2*, што ће у даљој каскадној реакцији условити активацију акспазе 3. Тестирани комплексни су демонстрирали осим антипролиферативног и антиметастатски ефекат.

Кључне речи: програмирана ћелијска смрт; канцерогенеза; једињења паладијума; карцином простате; ћелијска деоба.

ABSTRACT

As a transition metal, palladium can form complex compounds; therefore, a large number of palladium complexes with different ligands have been synthesized to test the antitumor effect and selectivity of potential chemotherapeutics. Such compounds have shown a powerful antiproliferative effect on various cancer cells.

Therefore, our study aims to define the antiproliferative effect of three synthesized Pd(II) complexes, which we have designated as *Pd1*($C_{28}H_{24}N_2O_4Pd$), *Pd2* ($C_{30}H_{28}N_2O_4Pd$), and *Pd3*($C_{34}H_{30}N_4O_2Pd$) on DU-145 and PC-3 cells (prostate carcinoma cell lines). The methods used in our study are MTT assay, apoptosis assay, detection of cell division using PI staining, and analysis of regulatory molecules of the intrinsic mitochondrial pathway.

By systematic analysis of the data, the study demonstrated that all three Pd(II) compounds have a strong antiproliferative effect on malignant prostate cells. On the other hand, the compounds show a very weak antiproliferative effect on fibroblasts. The reduction in the viability of the tested cancer cells by the Pd(II) complexes was due to the induction of early apoptosis. In addition, the tested compounds also led to cell cycle arrest. Apoptosis is activated by the mitochondrial pathway, whereby the Bax/Bcl-2 ratio changes within the cell, which, in a further cascade reaction, will cause the activation of caspase 3. The tested complexes demonstrated, in addition to the antiproliferative effect, an antimetastatic effect.

Keywords: programmed cell death; carcinogenesis; palladium compounds; prostate cancer; cell division.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
КАНЦЕРОГЕНЕЗА	2
ОНКОГЕНИ.....	2
ТУМОР СУПРЕСОР ГЕНИ.....	3
МЕТАБОЛИЗАМ МАЛИГНИХ ЋЕЛИЈА.....	3
КАРЦИНОМ ПРОСТАТЕ.....	4
АНАТОМИЈА ПРОСТАТЕ.....	4
ЕПИДЕМИОЛОГИЈА.....	5
ПРОГРАМИРАНА ЋЕЛИЈСКА СМРТ.....	6
КОМПОНЕНТЕ СПОЉАШЊЕГ АПОПТОЗОТСКОГ ПУТА.....	7
КОМПОНЕНТЕ УНУТРАШЊЕГ МИТОХОНДРИЈАЛНОГ ПУТА.....	9
ПЕРФОРИН/ГРАНЗИМ ПУТ	12
НЕКРОЗА	12
ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС	15
АНТУТУМОРСКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА МЕТАЛА	18
ЦИСПЛАТИНА.....	20
ЛЕКОВИ КОЈИ СЕ КОРИСТЕ У ТЕРАПИЈИ КАНЦЕРА.....	23
КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА.....	24
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	27
ИСТРАЖИВАЧКЕ ВАРИЈАБЛЕ	29
ТЕСТ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МТТ	29
ДЕТЕКЦИЈА АПОПТОЗЕ <i>ANNEXIN V/PI</i> ТЕСТ.....	30
ДЕТЕКЦИЈА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА.....	31
ДЕТЕКЦИЈА МОЛЕКУЛА АПОПТОЗЕ.....	32
АНАЛИЗА АНТИМЕТАСТАТСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА.....	33
4. РЕЗУЛТАТИ	34
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>PC-3</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 24 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ.....	35
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>PC-3</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 48 ЧАСОВА ИНКУБАЦИЈЕ	37
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>PC-3</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 72 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ.....	39
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>DU-145</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 24 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ	42

АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>DU-145</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 48 ЧАСОВА ИНКУБАЦИЈЕ	44
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>DU-145</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 72 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ	46
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>MRC5</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 24 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ	49
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>MRC5</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 48 ЧАСОВА ИНКУБАЦИЈЕ	51
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА <i>MRC5</i> ЋЕЛИЈЕ НАКОН 72 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ	53
ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ АПОПТОЗУ	56
КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС	58
АКТИВАЦИЈА АПОПТОЗЕ.....	60
ФРАКЦИЈА ПРЕЖИВЉАВАЊА.....	63
5.ДИСКУСИЈА	64
6. ЗАКЉУЧАК.....	71
РЕФЕРЕНЦЕ	73

1.УВОД

КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Тумори обухватају скуп различитих болести где постоји јасна разлика у етиологији, метаболизму, клиничкој слици и начину лечења (1). На основу свог порекла малигнитете смо поделили на карциноме (потичу од епителних ткива), саркоме (потичу од мезенхимних ткива), леукемије и лимфоме и дискрзије плазма ћелија (потичу од хематопоетског ткива) (1, 2). Уколико изостане инвазија ткива неоплазма је бенигна (2). Оно што је заједничко за све врсте малигнитета је да настају од малигно наизмењених ћелија које се у процесу онкогенезе конвертују у канцерске ћелије (1, 2). Главна карактеристика канцерогенезе је неконтролисана деоба ћелија која је праћена поремећајем процеса програмиране ћелијске смрти, услед чега долази до инвазије ткива и у даљем развоју до метастазирања (2, 3). Према томе малигно трансформисане ћелије немају адекватну контролу раста, а разлог томе је изостанак одговора на регулаторне механизме ћелијског раста и пролиферације (1-3). Услед саме инфилтрације канцера у околно ткиво може доћи до нарушавања структуре ткива као и губитка физиолошке функције (3, 4). Карактеристике малигно трансформисаних ћелија су аутономни и инфилтративни раст, недиференцираност и примитивна грађа, способност метастазирања и промењени метаболизам (3).

Кључну улогу у процесу малигне трансформације има генска мутација па можемо рећи да је у основи канцер генска болест (3, 5). Малигна ћелија настаје настаје услед акумулације многобројних оштећења при чему је превазиђен механизам „поправке“. Прецизније, малигну трансформацију омогућава прекомерна активација гена чија је основна улога у промоцији ћелијске деобе као и иреверзибилни губитак функције гена који имају улогу у инхибицији ћелијског раста (5, 6). Такође, у узрочнике за развој малигнитета сврставамо различите врсте зрачења, хемијске канцерогене компоненте као и онкогене вирусе (3).

ОНКОГЕНИ

Онкогени узрокују трансформацију нормалних ћелија у малигне ћелије тако што мењају физиолошке сигнале услед чега долази до губитка контроле раста и пролиферације, па је последица свега наведеног неконтролисана деоба (3, 7).

Први идентификовани онкогени су *ras* онкогени. Протеини које кодирају *ras* гени су локализовани у унутрашњој површини ћелијске мембране и учествују у преносу митогених сигнала (7, 8). Стога, активирање *Ras* молекула је неопходно за развој и диференцирање ћелија. Активација *ras* онкогена је повезана са тачкастим мутацијама у *ras* протоонкогену (8). Последица ове мутације је стварање активног облика *Ras* протеина услед чега се јавља неконтролисана ћелијска деоба. *Ras* онкоген је детектован код 95% тумора панкреаса, 40% тумора колона, 30% тумора плућа и у доста мањем проценту код других врста малигнитета (9, 10).

Протоонкоген *c-myc* његов продукт *p62* су веома битни у одвијању процеса репликације и транскрипције. Појачана експресија *c-myc* онкогена је детектована код Т и В лимфома, леукемије и саркома (3, 11).

Продукт *bcl-2* онкогена је мембрански протеин који је локализован на спољашњој мембрани митохондрија као и на мембрани ендоплазматског ретикулума (12). Овај протеин игра фундаменталну улогу у инхибицији програмиране ћелијске смрти (12). Поремећај у експресији *bcl-2* гена је детектован у раној фази карцинома колона, док је *Bcl-2* протеин снажно експримиран код различитих хематолошких малигнитета (13, 14). Истраживања су показала да је резистенција на хемиотерапију повезана са појачаном експресијом *bcl-2* гена (14).

У настанку хроничне мијелоидне леукемије јавља се транслокација *abl* протоонкогена са хромозома 9 на хромозом 22 (9:22). Последица је фузија *abl* са геном *bcr* при чему настаје фузијски протеин *Bcr/Abl* који има есенцијалну улогу у малигној трансформацији ћелије (15).

ТУМОР СУПРЕСОР ГЕНИ

Осим промена у експресији онкогена у процесу канцерогенезе је веома битан губитак или инактивација тумор-супресорских гена. Улога тумор-супресорских гена је у инхибицији неконтролисаног раста и диференцијације канцерских ћелија. Прецизније протеини које кодирају тумор-супресорски гени спречавају ћелијску деобу и развој канцера (16, 17).

Локација гена *p53* је на хромозому 17q, а његов продукт *p53* има кључно ангажовање у регулацији ћелијског циклуса. Стога, уколико дође до делеције гена протеин *p53* губи контролно деловање (18). Код 75-80% карцинома колона присутна је делеција у једном *p53* алелу и тачкаста мутација у другом алелу (19). Такође, код 70% карцинома дојке присутна је делеција *p53* гена (20). У серуму пацијената са карцином дојке и плућа детектована су циркулишућа антитела на мутиране *p53* протеине (21, 22).

BRCA1 и *BRCA2* су тумор-супресорски гени (енг. breast cancer gene) идентификовани на хромозому 17q21 и хромозому 13q12. Протеини *brca 1* и *brca 2* имају есенцијалну улогу у механизмима поправке ДНК молекула, регулацији транскрипције и регулацији ћелијског раста (23). Последица мутација гена *BRCA1* и *BRCA2* је губитак функције ензима који учествују у „поправци“ ДНК молекула. Стога, јасно је да су мутације *BRCA* гена повезане са повећаним ризиком од развоја карцинома дојке и јајника. Код особа код којих је детектована мутација *BRCA-1* гена ризик за развој карцинома дојке већи је од 80% (3, 24).

МЕТАБОЛИЗАМ МАЛИГНИХ ЋЕЛИЈА

Метаболичке промене у малигним ћелијама обухватају појачану синтезу ДНК молекула, појачану синтезу РНК молекула и нуклеотида. Такође, присутан је и поремећај репликације митохондријске ДНК (25). У метаболизму малигно измењене ћелије постоје квантитативне и квалитативне промене у метаболизму протеина. Прецизније долази до промена протеинског састава, промењена је фосфорилација протеина, активност поједних ензима и појачано је отпуштање протеолитичких ензима (25, 26).

Малигне ћелије имају смањен капацитет ћелијског дусања услед смањеног броја митохондрија. Састав митохондријалних мембранских протеина и липида је промењен при чему је повећан унос и смањено отпуштање калцијума из митохондрија. Услед смањења активности ензима коју учествују у антиоксидативној заштити долази до накупљања рекативних кисеоничних врста и липидне пероксидације (27, 28).

Повећана активност ензима глукозо-6-фосфат дехидрогеназе код малигно измењених ћелија активира пентозни пут разградње глукозе. Услед појачаног одвијања пентозног пута разградње глукозе, долази до повећаног стварања пентоза које даље учествују у синтези нуклеотида (29). Осим тога, појачаном анаеробном гликолизом малигне ћелије обезбеђују потребну енергију. У последњем кораку метаболичког пута анаеробне гликолизе долази до редукције пирувата у лактат каталитичком активношћу ензима лактат дехидрогеназе. Дакле у ћелијама се ствара више лактата што доводи до стања ацидозе у ћелијама чиме се активирају и отпуштају лизисомске хидролазе (30).

Плазма мембрана канцерске ћелије се разликује у саставу од ћелијске мембране малигно неизмењене ћелије. Разлика се првенствено огледа у вишку холестерола и мању незасићених масних киселина. Такође, присутно је мање гликолипида и постоје промене и у саставу мембранских протеина (31). Измењена је и активност ензима који су локализовани у плазма мембрани. Смањена активност ензима аденилат циклазе има за последицу смањење концентрације *cAMP*у малигним ћелијама, што се даље одражава на саму ензимску активност (3).

Код малигно измењенх ћелија долази до губитка нормалних антигена при чему долази до појаве антигена који су специфични за канцерске ћелије (нпр. *CEA* енг. *carcinoembryonic antigen*) (32). Промене у саставу плазма мембране узрокују и појачан активни транспорт шећера, аминокиселина и јона, а све у циљу доступности супстрата за убрзану пролиферацију (31).

Стварању метастаза доприноси смањена адхезивност услед недостатка фибронектина. Да би се створила метастатска промена неопходно је да једна малигна ћелија доспе далеко од примарног настанка (33, 34).

КАРЦИНОМ ПРОСТАТЕ

Године 2020. према подацима Светске здравствене организације карцином простате представља трећи најчешће дијагностиковани малигнитет код мушкараца (35). Са 1.414.259 случајева годишње у свету, карцином простате се налази на трећем месту по учесталости јављања, где прво и друго место заузимају карцином плућа и колона (35, 36). Инциденција малигнитета простате је повећана уразвијеним земљама (35, 37). Карцином простате је водећи узрок смрти код мушкараца у великом броју земаља (48/185 земаља) са 375 000 смртних случајева забележених у 2020. години (38). Ипак, важно је напоменути да апсолутне вредности смртних случајева у последњој деценији опадају, захваљујући раном откривању мерењем простата-специфичног антигена (39). Према подацима из 2008. године малигнитет простате налази се на трећем месту по учесталости у Србији (40).

АНАТОМИЈА ПРОСТАТЕ

Простата је локализована у карлици, окружена је ректумом, бешиком, перипростатичним и дорзалним венским комплексима и неуроваскуларним сплетовима који су задужени за еректилну функцију као и уринарним сфинктером који је задужен за пасивну контролу урина. Структуру простате чине тубулоалвеоларне жлезде које су окружене фибромишићном стромом. Ацинусна јединица је изграђена од епитела који се састоји од епителних, базалних и неуроендокриних ћелија. Строма је изграђена од фибробласта и ћелија глатких мишића. Простата специфични антиген (PSA) и простатична кисела фосфатаза (PAP) се стварају у самим епителним ћелијама. Епителне ћелије као и ћелије строме у својој структури садрже андрогене рецепторе тако да њихов раст зависи од андрогена. Ензим који је присутан у самој жлезди 5- α редуктаза конвертује тестостерон у дихидротестостерон. Периуретрални режањ се повећава током пубертета и након 55. године живота. У периферој зони долази до развоја већине карцинома, при чему се малигнитети на том месту могу напипати дигиторекталним прегледом (2, 41, 42).

ЕПИДЕМИОЛОГИЈА

У факторе ризика за развој малигнитета простате убрајамо старење, расна припадност и позитивна породична анамнеза. Епидемиолошке студије недвосмислено указују да је повећан ризик од настанка карцинома простате присутан уколико је један сродник у првом степену крвног сродства оболео. Постоје јасни показатељи да је око 55% случајева ране дијагнозе канцера простате наследно (43, 44). Такође, дијагноза малигнитета простате је учесталија код Афроамериканаца и повезана је са лошијом прогнозом. Сматра се да фактори животне средине и исхрана играју улогу у развоју канцера простате. Повећан унос масти путем хране (α -линоленска киселина и полициклични ароматични угљоводоници) повећавају ризик од развоја малигнитета простате (45, 46). Осим тога, повећање ризика од настака канцера простате се јавља и код одређених занимања, рад у индустрији хемикалија, лекова. Улогу у настанку канцера простате има хиперметилација промотера гена *GSTP1* чиме долази до инхибиције експресије гена који врши детоксикацију канцерогена. Такође, настанку малигнитета доприноси и пролиферативна инфламаторна лезија (*PIA*) (47).

Посебан проблем када говоримо о дијагнози канцера простате је асимптоматска фаза, при чему се пацијенти обраћају лекару тек када дође до субвезикалне опструкције (48). Дијагноза се поставља на основу физикалног прегледа при чему се абнормалности могу утврдити дигиторекталним прегледом. Дигиторекталним прегледом можемо дефинисати величину, конзистентност и абнормалности у простати. Карциноми су тврди, нодуларни и неправилни у облику (49).

Простата-специфични антиген (*PSA* енгл. *Prostate-Specific Antigen*) је ензим серин протеаза кога производе малигно неизмењене као и малигне ћелије епителне ћелије. Представља једноланчани протеински молекул масе 33kDa. Простата-специфични антиген се у циркулацији налази у везаном облику за $\alpha 1$ -антихимотрипсин и $\alpha 2$ макроглобулин док 10-30% представља слободну невезану фракцију *fPSA* (50, 51). Улога *PSA* је у разводњавању семеног коагулума, специфичан је за простату али не и за канцер простате. Мерење концентрација *PSA* подразумева примену имунохемијских метода где можемо детектовати слободну фракцију и *PSA* који је у комплексу са $\alpha 1$ -антихимотрипсином. Осим код карцинома простате, повећана концентрација *PSA* у серуму је присутна и код простатитиса (запаљење простате), бенигне хиперплазије простате и инфекција уринарног тракта. За разлику од дигиторекталног прегледа који нема утицај на концентрацију *PSA* у серуму, биопсија простате повећава десетоструко концентрацију *PSA* (8-10 недеља након извршене биопсије). Године 1994. Америчка управа за храну и лекове *FDA* је одобрила тест на *PSA* у циљу раног дијагностиковања малигнитета простате (51). Осим значаја у раној дијагнози канцера, постоји јасна позитивна корелација између повећане концентрације *PSA* и смртог исхода. Прецизније, највећи број смртних исхода од малигнитета простате је присутан код пацијената код којих су нивои *PSA* у горњем квантилу (50, 51). Треба такође истаћи да код пацијената са концентрацијом *PSA* испод референтне вредности могу постојати малигне ћелије у простати. Концентрације *PSA* код мушкараца са присутном упалом простате (простатитисом) су изнад референтних вредности па је неопходно да се пре мерења примени антибиотска терапија (50, 52). Код бубрежних пацијената и код пацијената са оболелом јетром могу се наћи лажно повећане вредности *PSA* (52). Након радикалне простатектомије концентрација *PSA* мора бити испод границе осетљивости методе (51). Стога, пораст концентрација *PSA* може указати на сам повратак болести па је мерење овог антигена битно у откривању рецидива.

Дефинитвна дијагноза малигнитета простате се поставља биопсијом, директна визуелизација трансректалним ултразвуком (*TRUS*) или магнетном резонанцом (*MR*) омогућава узимање исечка (53, 54).

Уколико је болест клинички локализована (без присуства метастаза) може се применити радикална простатектомија, радиотерапија или активно праћење. У оболеле од некастратног рака простате убрајају се мушкарци са видљивим метастатским променама и некастратним нивоима тестостерона ($\geq 50\text{ng/dl}$)(2). Терапија у овом случају подразумева смањење нивоа андрогена медикаментозним или хирушким средствима као блокирање андрогена применом антиандрогена (2, 53). Малигнитет простате резистентан на кастрацију дефинише се као болест која напредује независно од медикаментозне и хирушке терапије при чему су измерене концентрације тестостерона $\leq 50\text{ng/dl}$ (2). Дакле, уколико је присутна дуготрајна терапија антиандрогенима постоји могућност јављања хормонске резистенције па се у терапији могу применити и поједини цитостатици али је њихов ефекат лимитиран.

Из претходно наведених разлога циљ наше студије је био развој потенцијалних хемиотерапеутика и испитивања њиховог цитотоксичног ефекта на ћелије карцинома простате.

ПРОГРАМИРАНА ЋЕЛИЈСКА СМРТ

Апоптоза или програмирана ћелијска смрт представља есенцијални процес за одржавање ткивне хомеостазе. Апоптозу су открили и дефинисали *Kap* и сарадници 1972. године. Године 2002. Нобелову награду за физиологију и медицину добили су *Sydney Brenner, Horvitz and John E Suston*, за истраживања у пољу апоптозе (55). Сматра се да је апоптоза кључни процес у елиминацији „нежељених“ ћелија у организму. У физиолошким условима апоптоза је неопходна током ембрионалног развића и такође кључну улогу има у заштити од имунског одговора и елиминацији оштећених ћелија (56). Постоји велики стимулус који могу активирати процес апоптозе, на пример радијација и хемиотерапија индукују оштећење *ДНК* молекула малигне ћелије и индукују програмирану ћелијску смрт. У развоју канцера доказано је да апоптоза има есенцијалну улогу. Прецизније студије су показале да у канцерогенези након процеса иницијације, инхибиција апоптозе је кључни корак (57).

Веома је битно разликовати процесе апоптозе и некрозе. Оба процеса су независна и доводе до ћелијске смрти. Који ће се претходно поменути процес активирати зависи од интензитета самог стимулуса. Стимулуси као што су хипоксија, радијација могу довести до активације апоптозе, али уколико интензитет расте активира се процес некрозе (56). Приликом активирања процеса некрозе долази до запаљенске реакције док код процеса апоптозе неће се активирати имунски одговор и нема запаљенске реакције. Карактеристике апоптозе су прецизна контрола самог процеса, изостанак инфламације и активација проапоптотског молекула (каспаза) (56, 58).

У циљу покретања процеса апоптозе неопходно је активирати један од два кључна сигнална пута. У сигналне путеве апоптозе спадају спољашњи пут (активација рецептора смрти) и унутрашњи пут (активиран преко митохондрија) (59, 60).

Након што је активиран један од два сигнална пута, мења се концентрација и однос регулаторних молекула апоптозе при чему долази до промене у пермеабилности митохондријалне мембране и активације каспазе 3. У следећем кораку јавља се фрагментација *ДНК* молекула, деградација протеина и цитоскелета, формирају се апоптотска телашца и на крају бивају фагоцитована од стране макрофага (56).

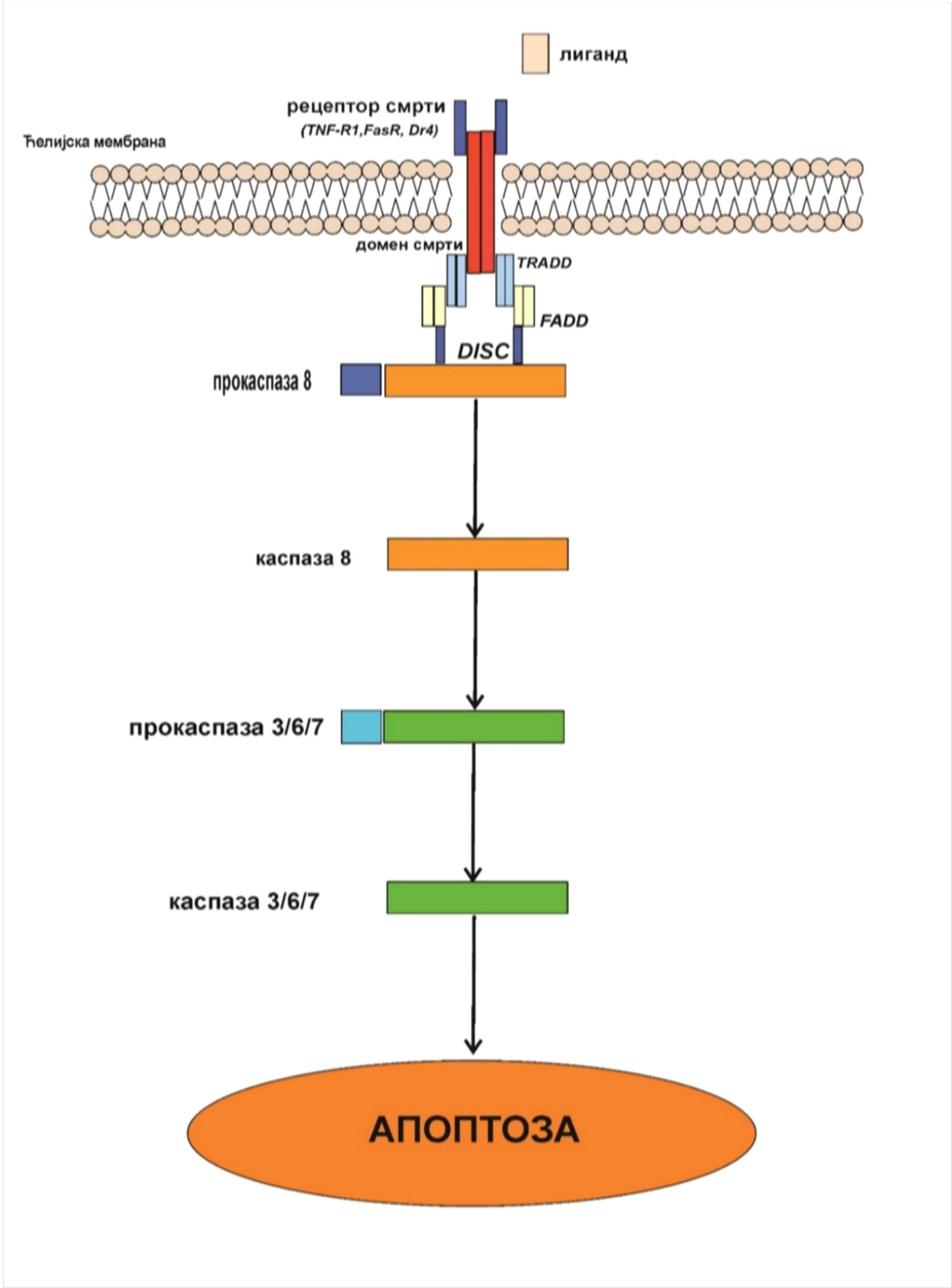
КОМПОНЕНТЕ СПОЉАШЊЕГ АПОПТОТОТСКОГ ПУТА

Спољашњи апоптотски пут је активиран посредством протеина рецептора смрти. Протеини рецептори смрти су *TNF-R1* (енг. *Tumor necrosis factor receptor 1*), *DR4/DR5, TNF-R* (енг. *Tumor necrosis factor receptors*), *TRAIL-R* (енг. *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors*) и локација је на површини различитих ћелија (слика 1) (61). На самој површини ћелије ови рецептори долазе у контакт са одговарајућим лигандима, долази до активације домена смрти и привлачења унутарћелијских адапторних молекула *FADD* (енг. *FADD, Fas associated death domain*). Након тога, наредни корак се огледа у конвертовању прокаспазе 8 у активну каспазу-8. Каспаза-8 је неопходна за конвертовање прокаспазе-3 у активну каспазу-3 (62). Најбоље проучени лиганди и рецептори смрти су *CD95/FasR*, *TNF- α /TNF-R1*, *Apo2L/DR4* и *Apo2L/DR5*. Најдетаљније проучени *TNF* рецептор се састоји од екстрацелуларног домена који је богат цистеином и цитоплазматског домена (*death domain*) који преноси сигнале унутар ћелије и активира ћелијску смрт. Након што се лиганд веже за *TNF* рецептор долази до димеризације цитоплазматског домена рецептора и активације каспазе 3 и каспазе 10 (63). Активирани каспазе 8 и 10 у последњем кораку иницирају апоптозу тако што активирају егзекуторне каспазе-3, -6, -7 (64).

Рецептор *Fas* (*CD95, tumor necrosis factor receptors superfamily member 6 (TNFRSF6)*) је локализован на површини различитих ћелија у нашем организму и везивањем одговарајућег лиганда долази до активације апоптозе. Прецизније, *FasL* (лиганд) везје се за одговарајући *FasR*, долази до формирања *FADD* у цитоплазматском делу и иницира се апоптотска каскада. Лиганд *FasL* је експримиран на површини имунских *T* ћелија (65). Молекулска маса овог лиганда износи 40 *kDa* кодиран геном на хромозому 1. Молекулска маса *FasR* износи 49 *kDa*, ген који кодира синтезу је локализован на хромозому 10. Рецептор *Fas* у својој структури садржи три домена, екстрацелуларни домен (изграђен од 157 аминокиселина), трансмембрански домен (изграђен од 17 аминокиселина) и цитоплазматски домен (садржи 145 аминокиселина). Сама присутност *FasL* на површини имунских *T* ћелија има есенцијалну улогу у спречавању аутоимунске реакције. Активирани сигнални пут *FasL/FasR* има фундаменталну улогу у регулацији како физиолошких тако и патолошких процеса. У прилог томе нам говоре студије које су доказале да код различитих типова карцинома (малигнитети плућа, оваријума и дојке) лошија прогноза је директно повезана са поремећајем у сигналном путу *FasL/FasR* (66).

TNF α (енг. *Tumor necrosis factor- α*) је цитокин молекулске масе 17 *kDa*, садржи 157 аминокиселина, ген који кодира овај протеин је локализован на хромозому 6. Синтеза *TNF α* се одвија у макрофагима, *T* лимфоцитима и *NK* ћелијама (енг. *Natural killer cells*) (67, 68). Протеин *TNF α* се везује за одговарајући екстрацелуларни домен рецептора *TNF-R1* и затим до активације адапторних протеина *TRADD*. Активацијом *TNF α /TNF-R1* долази до активације проинфламаторне и проапоптотске каскаде (69). Експресија *TNF- α /TNF-R1* је одређивана код великог броја кацерских линија и доказана је директна корелација са прогнозом болести (70).

Рецептор *DR3* (енг. *Death receptor 3*) припада *TNFR* суперфамилији рецептора, молекулска маса износи 53.5 *kDa*, а ген који кодира синтезу овог протеина налази се на хромозому 1 (71). Овај рецептор интерагује са одговарајућим лигандом *Apo3L* при чему се активира процес апоптозе. *Apo3L* је протеин који садржи 249 аминокиселина и ген који кодира је локализован на хромозому 17. Улога *Apo3L/DR3* у канцерогенези је проучавана код многих типова малигнитета (72). Студије су показале да је смањена експресија *DR3* рецептора присутна код ћелијских линија карцинома дојке *MCF-7* и *MDAMB-231* у поређењу са малигно неизмењеним ткивом дојке (73).



Слика 1. Процес активације спољашњег апоптотског пута путем рецептра смрти.

КОМПОНЕНТЕ УНУТРАШЊЕГ МИТОХОНДРИЈАЛНОГ ПУТА

Осим активације спољашњег апоптотског пута, програмирана ћелијска смрт може бити индукована оштећењем *ДНК* молекула или појачаном продукцијом реактивних кисеоничних врста (оксидативни стрес). Прецизније, оштећење *ДНК* молекула и оксидативни стрес активирају програмирану ћелијску смрт путем унутрашњег митохондријалног пута (слика 2). Чланови *Bcl* фамилије протеина укључујући *Bax* и *Bcl-2* (проапоптотични и антиапоптотични), локализовани су на митохондријалној мембрани и кључни су у регулацији унутрашњег пута. Митохондријални пут карактерише ослобађање цитохромасиз митохондрија у цитоплазму услед повећање пропустљивости митохондријалне мембране (74, 75). Ослобађање цитохромас условљава формирање комплекса, који називамо апоптозом, са *APAF 1* (енг. *apoptotic protease activating factor 1*) и прокаспазом-9. Овај формиран комплекс индукује конвертовање прокаспазе-9 у активну каспазу-9 при чему се у следећим корацима активирају егзекуторне каспазе-3,-6,-7 и комплетира се процес апоптозе (76).

На основу физиолошке улоге у нашем организму *Bcl-2* (енг. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) протеине смо поделили у три велике групе, антиапоптотски (*Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bclw*, *Mcl-1*, *BFL-1/A1*), проапоптотски (*Bax*, *Bak* и *Bok*) и проапоптотски који садрже само *BH3* домене (*Bad*, *Bid*, *Bik*, *Bim*, *BMF*, *HRK*, *Noxa* и *PUMA*). Можемо закључити да активација апоптозе зависи од односа проапоптотских и антиапоптотских протеина унутар ћелије (77).

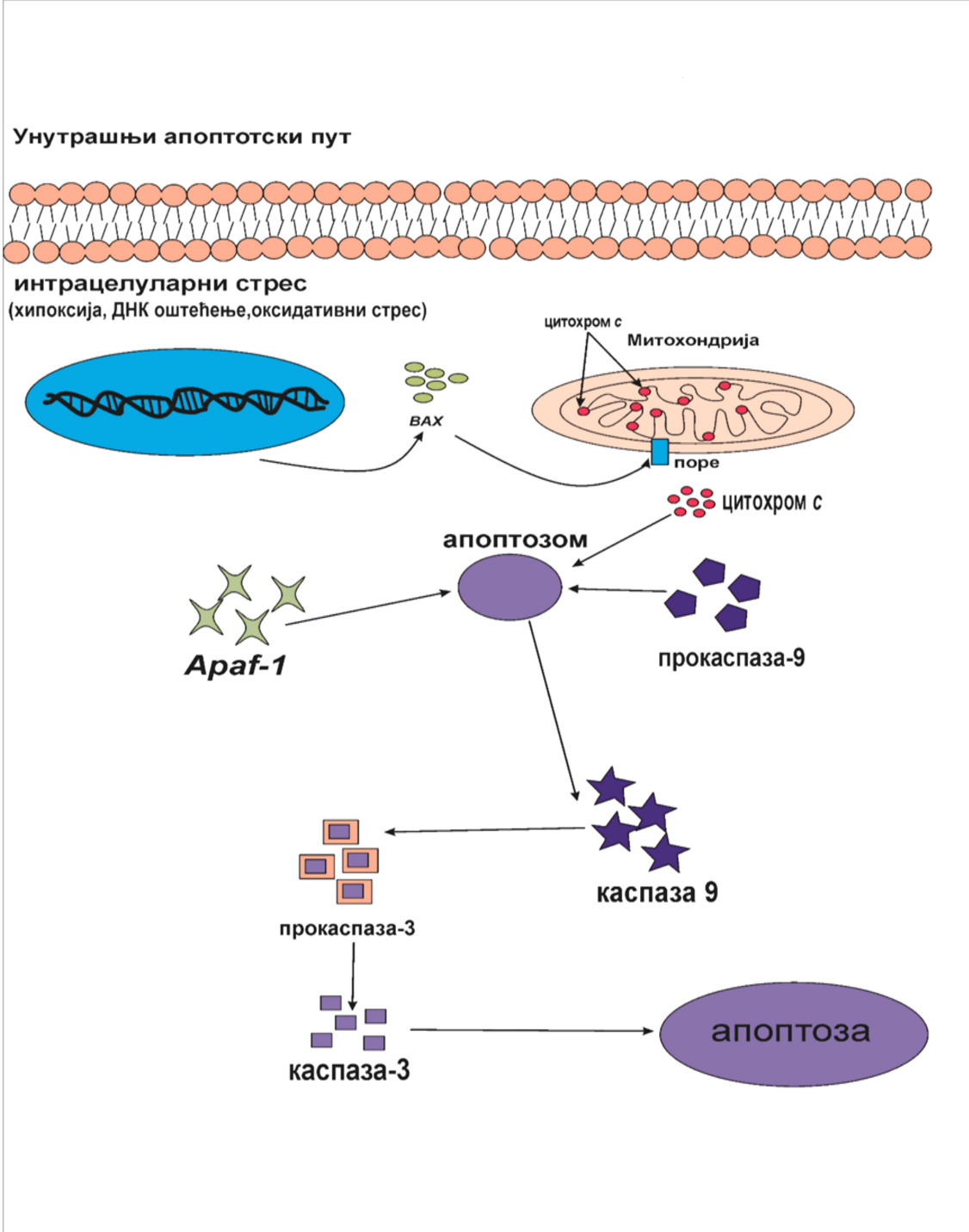
Антиапоптотски протеини, *Bcl-2*, *Bcl-xl* инхибирају програмирану ћелијску смрт, митохондријални пут. Прецизније, ови протеини су детектовани на спољашњој митохондријалној мембрани и заустављају каскаду програмиране ћелијске смрти спречавањем ослобађања цитохрома сиз митохондрија у цитосол ћелије (78). Сматра се да у процесу развоја канцера есенцијалну улогу има поремећај експресије антиапоптотичних протеина. На пример, код различитих ћелија канцера доказана је повећана експресија *Bcl-2* и *Bcl-xlin vitro*, што заправо омогућава малигним ћелијама да се неконтролисано деле и „избегну“ програмирану ћелијску смрт (79). Такође, студија која је проучавала експресију *Bcl-2*, *Bcl-X*, и *Mcl-1* антиапоптотичних протеина код аденокарцинома простате недвосмислено је показала да је погоршање болести, односно резистентност на терапију директно повезана са повећаном експресијом ових протеина (80). Даље, многе студије *in vitro* које су испитивале потенцијелане хемиотерапеутике су показале да приликом снаже антитуморске активности ових једињења долази до смањене експресије антиапоптотских протеина (81, 82, 83). Прецизније, смањена експресија условљава и смањење вијабилности канцерских ћелија.

У каскадној реакцији која чини апоптозу кључну улогу имају проапоптотски протеини. На пример, ако је процес апоптозе покренут кључни корак је хомодимеризација и олигодимеризација *Bax* и *Bak* протеина на спољашњој митохондријалној мембрани, што даље условљава трансфер цитохрома сиз митохондрија у цитосол (84). Многобројне *in vitro* студије које испитују антитуморски ефекат разних једињења су показала да сам однос између *Bcl-2/Bax* је од есенцијалног значаја за смањење вијабилности малигних ћелија (85, 86). Дакле, за саму активацију апоптозе неопходно је да се смањи однос *Bcl-2/Bax*. У прилог овоме говори и студија која је испитивала антитуморску активност комплекса паладијума на ћелије карцинома простате *PC-3* и *Du-145*. Истраживање је показало да смањење вијабилности ћелија аденокарцинома простате је условљено смањењем односа *Bcl-2/Bax* (87).

Цитохром *c* је мали, хидросолубилни молекул чија молекуларна маса износи свега 12 kDa. Овај молекул је кључна компонента унутрашњег митохондријаног пута, ослобађем цитохорма *c* из митохондрија у цитоплазму заправо је иницирана егзекуторна фаза апоптозе. У цитотолу ћелије услед активације апоптотског пута долази до везивања цитохорма *c* за *Apaf-1*, затим долази до олигомеризације и везивања прокаспазе-9. Као крајњи резултат, долази до протеолитичке активације прокаспазе-9 и прокаспазе-3 (88). Студије су показале да повећана експресија цитохрома *c* је повезана са смањењем вијабилности различитих канцерских ћелија *in vitro* (89, 90).

Егзекуторна фаза апоптозе представља финални корак у овом процесу и њега карактерише фрагментација молекула ДНК, деградација протеинских структура ћелије и формирање апоптотских телашца. Следећи корак подразумева фагоцитозу од стране макрофага. Есенцијалну улогу у овој последњој, егзекуторној фази има каспаза-3 која је неопходна за ћелијску фрагментацију. У претходно описаном кораку нема инфламаторног одговора (60).

Каспаза-3 (*CPP32*, *apopain*, *YAMA*) је ендопротеаза и спада у групу цистеин зависних специфичних протеаза. Овај протеин се састоји од две субједини. Структурно се састоји од две субјединице чије је молекулска маса 12 kDa и 17 kDa (91). Поремећај експресије каспазе-3 је присутан у канцерогенези. Студија која је испитивала ниво експресије каспазе-3 код ћелија карцинома простате *PC-3*, *DU-145*, *TSU-Pr1m*, *LNCaP* и код малигно неизмењених ћелија је показала да је код туморских ћелија присутна смањена експресија овог протеина (92).



Слика 2. Процес активације унутрашег (митохондријалног) апоптотског пута.

ПЕРФОРИН/ГРАНЗИМ ПУТ

Перфорин/гранзим пут је посебни сигнални апоптотски пут чије су најбитније компоненте гранзим А (*GzmA*) и гранзим Б (*GzmB*). Ови молекули су серин протеазе и ослобађају се из гранула које су локализоване у цитоплазми *NK* ћелија и цитотоксичних *T* лимфоцита. Овај сигнални пут је битан је у антитуморској и антивирусној одбрани (слика 3) (93, 94). Перфорини су протеини који креирају поре у ћелијској мембрани „*target*” ћелије и омогућавају улазак гранзима унутар ћелије. Када се нађе унутар ћелије, гранзим Б активира каспазу -10 и -9, при чему се у следећем кораку активира каспаза-3. Активирана каспаза-3 даље условљава *ДНК* фрагментацију и ћелијску смрт. Такође, гранзим А условљава фрагментацију *ДНК* молекула што ће у даљим каскадним реакцијама довести до апоптозе (95).

Гранзим Б је локализован у гранулама *NK* ћелија и цитотоксичних *T* лимфоцита и ген који кодира синтезу овог протеина је локализован на хромозому 14. Прогностички значај гранзима Б је описан у многим студијама. Код пацијаната код којих је дијагностикован карцином плућа и дојке показано је да повећана експресија гранзима Б испољава антиметастатски ефекат (96). Такође, студије које су проучавале аденокарцином простате (*PC-3* и *DUI45*) су показале да повећана експресија гранзима Б и перфорина индукујесмањену вијабилност туморских ћелија (97).

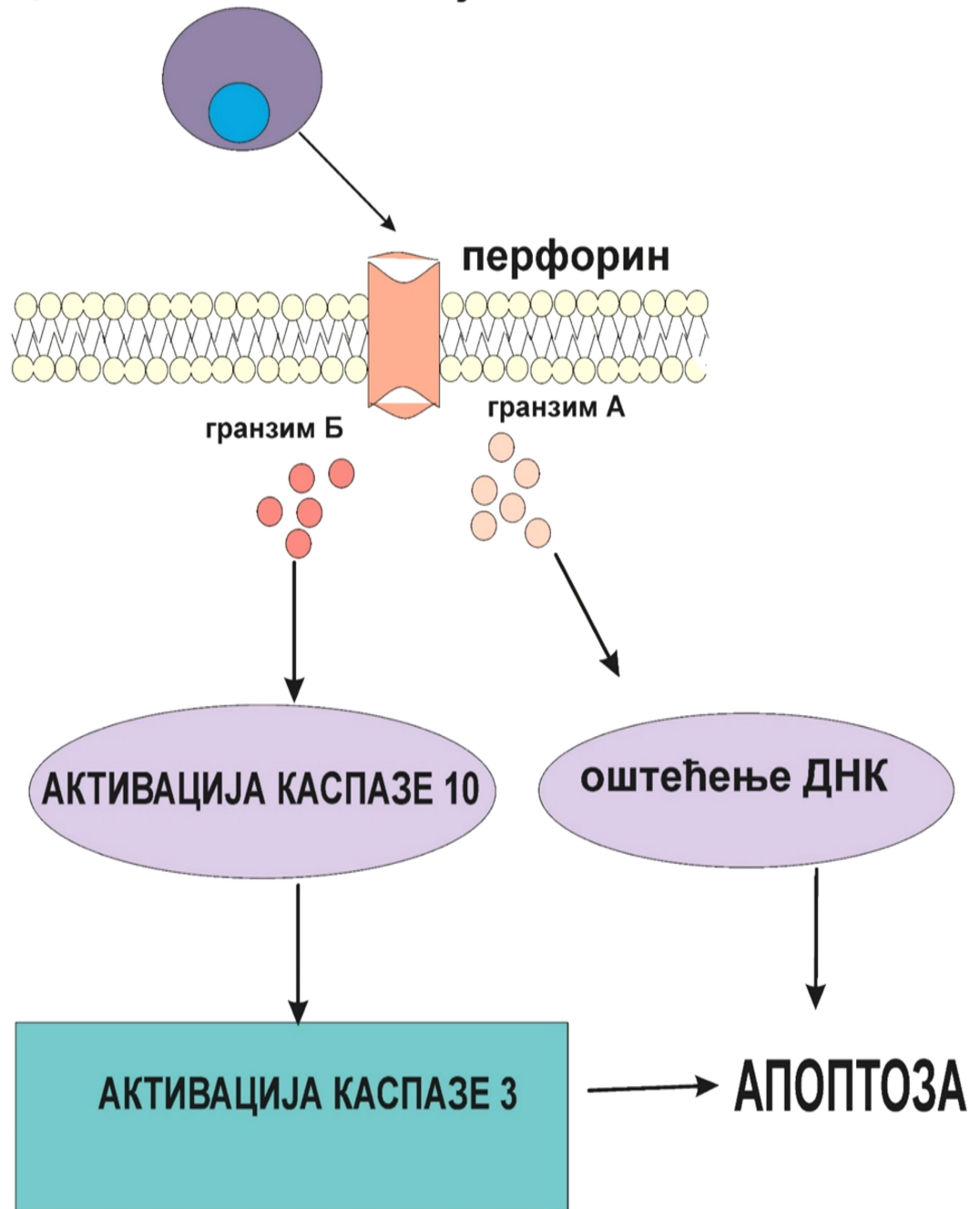
НЕКРОЗА

Некроза представља иреверзибилно ћелијско оштећење и ћелијску смрт која је условљена патолошким процесом. За разлику од апоптозе, некроза је неконтролисан процес која резултира оштећењем ћелијских органела, руптуром плазма мембране и преласком интрацелуларног садржаја у околно ткиво, чиме долази до оштећења истог (слика 4). За разлику од програмиране ћелијске смрти коју могу генерисати спољашњи и унутрашњи сигнали, некроза се активира увек услед штетног стимулуса изван ћелије, при чему долази до инфламаторног одговора и ослобађања *heat shock* протеина, *АТФ*-а, мокраћне киселине и нуклеарних протеина (98). Прецизније, уколико је присутна некроза долази до секреције проинфламаторних цитокина, на првом месту интерлеукин-1 бета (*IL1*).

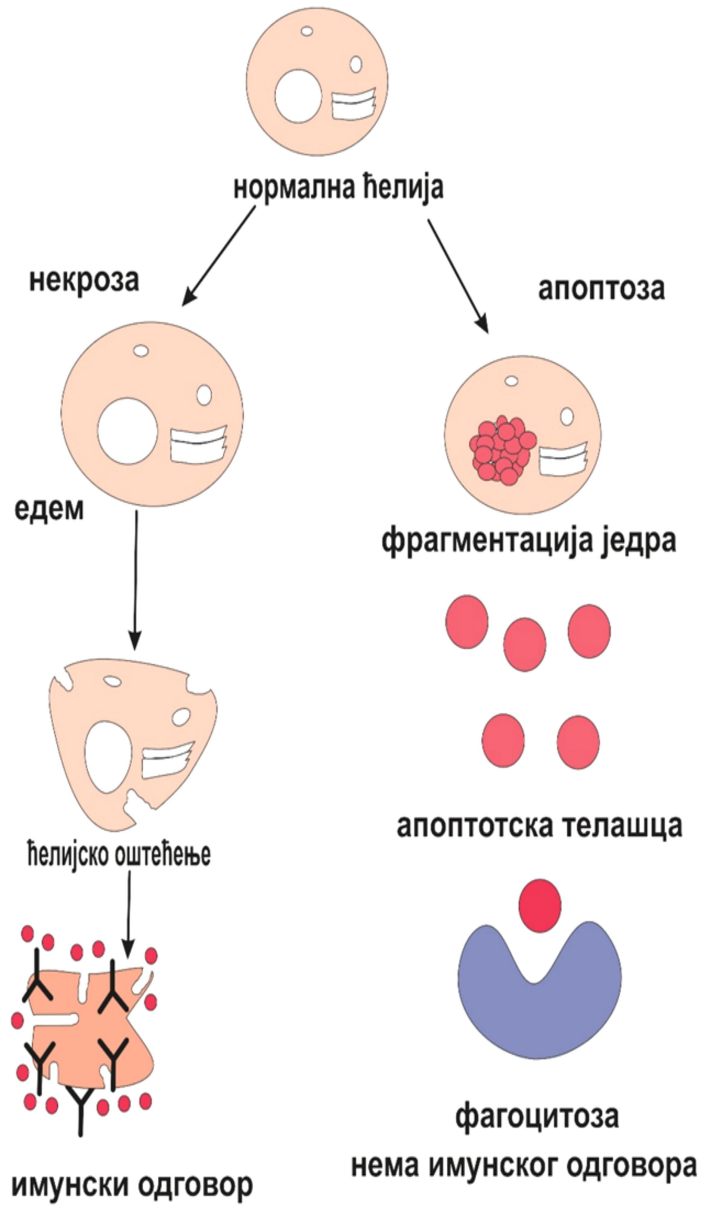
Узорци некрозе су:

1. Хипоксија
2. Физика оштећења
3. Хемијска оштећења
4. Биолошки агенси
5. Имунолошки одговор (98, 99)

цитотоксичне Т ћелије



Слика 3. Перфорин/гранзим сигнални пут



Слика 4. Разлика у одвијању процеса апоптозе и некрозе

ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС

За нормално одвијање физиолошких процеса у нашем организму неопходна је ћелијска пролиферација, односно одвијање ћелијског циклуса. Током овог процеса ћелија умножава своје компоненте и као производ добијамо две ћерке ћелије (100).

Само одвијање ћелијског циклуса је веома сложен и прецизно контролисан процес који је састављен од неколико фаза. Фазе ћелијског циклуса су *M* (фаза митозе), *S* (фаза синтезе ДНК молекула), *G₁* (фаза између митозе и *S* фазе, током *G₁* је ћелијска припрема за синтезу ДНК), *G₂* (ћелија се припрема за митозну деобу у две ћерке ћелије) (слика 5) (100).

Да би се ћелијски циклус одиграо неопходна је контрола два есенцијалне фазе, *S* фазе и *M* фазе. Прецизније постоје две контролне тачке у ћелијском циклусу, на почетку *S* фазе и на почетку *M* фазе. Ово је од веома битног значаја јер приликом оштећења ДНК молекула, ћелијски циклус ће се зауставити на једној или другој тачки. У људском организму се ћелије не деле увек, могу бити у мирној фази потпуно ван ћелијског циклуса, фаза *G₀*. Пример предствљају неурони, кардиомиоцити и ћелије скелетних мишића који проводе животни век у *G₀* фази. Наупрот томе, ћелије коштане сржи и гастроинтестиналног тракта деле се свакодневно. Да би ћелија из *G₀* фазе ушла у *G₁* фазу неопходан је сигнал фактора раста (101, 102). За одржавање саме хомеостазе у ткивима неопходан је баланс између ћелијске деобе и апоптозе.

Контролни систем одвијања ћелијског циклуса чине две фамилије протеина *ciklini ciklin-kinaze (cdk)*. Њихова улога је у фосфорилацији различитих различитих ензима и тиме утичу позитивно или негативно на саму ензимску активност. Треба напоменути да је сваки *cdk* инактиван док се не веже за циклин. Ово везивање је од есенцијалног значаја да *cdk* фосфорилише ензиме који су битни одређеној фази ћелијског циклуса. Циклин дефинише који ће се ензими фосфорилисати, а након фосфорилације циклин се разграђује. Све циклине смо поделили у осам група, за контролу ћелијске деобе од есенцијалног значаја су циклини *A, B, D* и *E* (103, 104).

G₁ фаза подразумева припрему ћелије за одвијање следеће *S* фазе. Синтезише се информациона РНК неопходна за репликацију ДНК молекула. Ову фазу карактерише пораст концентрације циклина *D*, формира се комплекс циклина *D/cdk* чиме се фосфорилишу неопходни протеини. циклин *D/cdk* фосфорилише *Rb* протеин ослобађајући транскрипциони фактор *E2F*, овим се активирају гени неопходни за *S* фазу, посебно циклини *E* и *A*. Ефекат *E/cdk* је неопходна за прелаз из *G₁* у *S* фазу, односно пролаз кроз контролну тачку 1 (105).

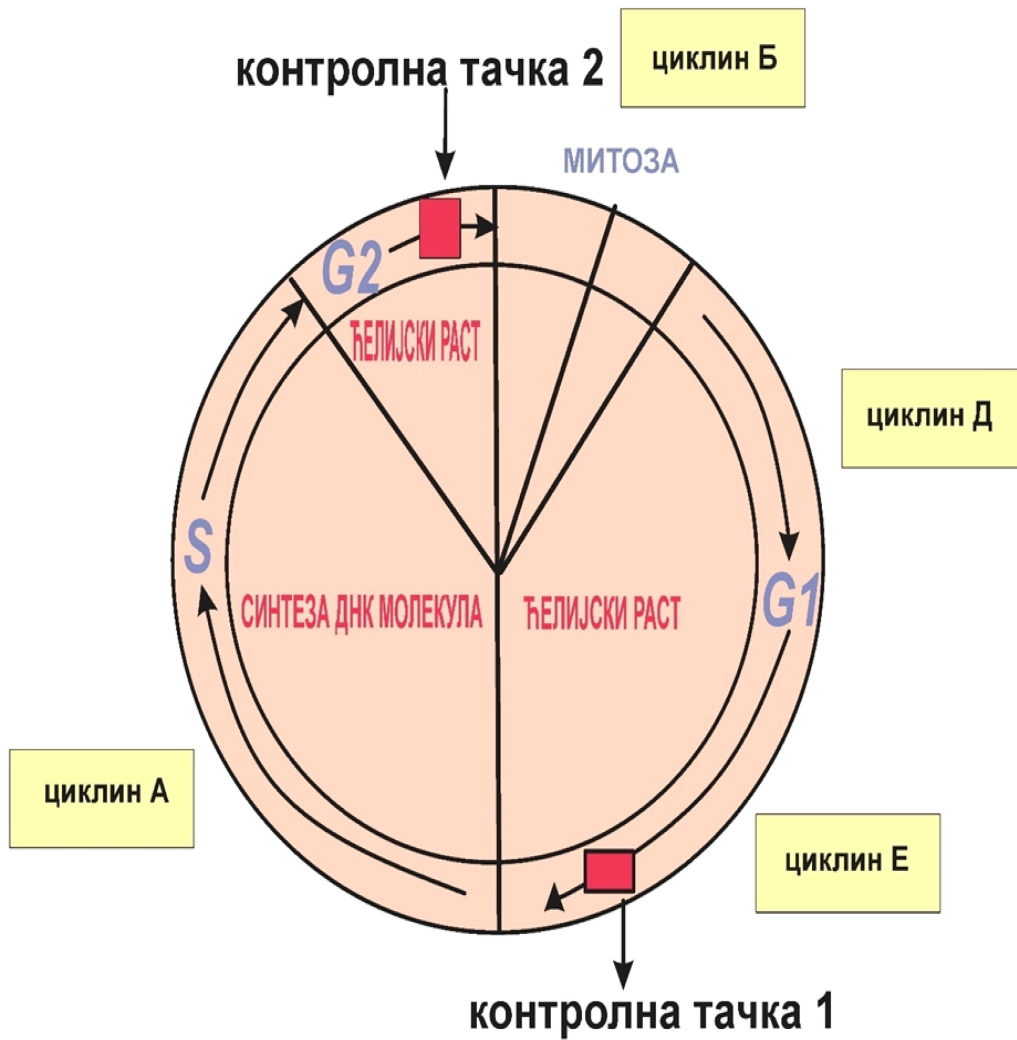
S фазу карактерише дуплирање генетичког материјала, при чему *E/cdk* и *A/cdk* контролишу ток ове фазе. Прецизније активирају протеине који учествују у синтези ДНК молекула (104).

G₂ фазу карактерише дуплиран број хромозома у ћелији, дуплирају се структурне компоненте ћелије, долази до синтезе великог броја ензима и информационе РНК. Да би ћелија прешла у *M* фазу неопходни су комплекси циклин *A/cdk* и циклин *B/cdk* (106).

Митозу чине четири фазе, профазе, метафаза, анафаза, телофаза. Профазу карактерише кондензација дуплираних хромозома, док у метафази хромозоми су поређани на екватору. Анафазу карактерише транспорт хромозома на супротне половине ћелије, док телофазу карактерише формирање мембране једра око хромозома у подела цитоплазме (100).

Од суштинског значаја је да уколико дође до поремећаја у одвијању ћелијског циклуса дође дио инхибиције истог у контролној тачки 1. Уколико дође до оштећења молекула *ДНК* заштитну улогу има протеин *p21* који инаktivира комплекс циклин/*cdk* на тај начин спречава фосфорилацију *Rb* и зауставља циклус у контролној тачки 1. Уколико је ова мера недовољна да заустави ћелијску деобу активира се протеин *p53* који индукује процес апоптозе (107, 108).

Када дође до поремећаја у ћелијском циклусу који контролни механизми нису у стању да реше, то може да доведе до развоја неконтролисане деобе и малигнитета. Стога, у развоју карцинома кључну улогу има избегавање контролних тачака ћелијског циклуса и апоптозе.



Слика 5. Фазе ћелијског циклуса

АНТУГУМОРСКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА МЕТАЛА

Открићем лека цисплатине 1960. године постигнут је велики успех у терапији малигнитета. Осим цисплатине, у хемиотерапеутике који садрже у својој структури платину убрајамо и карбоплатину и оксалиплатину (109, 110). Претходно поменути једињења су од веома великог клиничког значаја у лечењу карцинома тестиса, оваријума, колоне и плућа (109). Терапијску примену цисплатине, карбоплатине и оксалиплатине ограничава велики број нежељених ефеката као што су туморска резистенција (долази до појаве рецидива болести), нефротоксичност, хепатотоксичност, кардиотоксичност итд (111, 112).

У циљу превазилажења ових недостатака, синтетисан је велики број потенцијалних цитостатика који у својој структури садрже метал.

Веома значајна особина металних комплекса је могућност везивања за ДНК молекула (формирањем ковалентне везе) и тиме се инхибирају процеси репликације и транскрипције (113, 114). Даље, ова једињења након уласка у ћелију могу индуковати повећану продукцију реактивних кисеоничних врста (оксидативни стрес). Индукцијом оксидативног стреса долази до оштећења ДНК молекула и митохондријалне дисфункције што за последицу има активацију апоптозе (114). Истраживања су показала да комплексни метала могу инхибирати синтезу *VEGF* (енг. *vascular endothelial growth factor*), тиме се спречава ангиогенеза (115). Прецизније, инхибицијом ангиогенезе спречава се даљи развој тумора као и појава метастаза.

Комплекси рутенијума су се показали као веома добри кандидати у терапији малигнитета. Рутенијум је стабилан у оксидационим стањима *Ru(II)*, *Ru(III)* и може се везати за различите ћелијске структуре (ДНК молекула, протеини). Осим тога, једињења рутенијума се могу везати за хумани серум албумин и трансферин. Малигно измењене ћелије услед поремећеног метаболизма имају повећане потребе за гвожђем и на ћелијској мембрани се налази већи број трансферинских рецептора. Овим је омогућено ефикасније допремање једињења рутенијума до малигнућ ћелија (85, 116, 117). Студије су показале да у поређењу са једињењима платине, рутенијум комплексни показују већи степен селективности *in vitro* (85). Прецизније, показан је снажан анитуморски ефекат једињења рутенијума на канцерске ћелије, док је значајно слабији цитотоксични ефекат показан на малигну неизмењеним ћелијама. Такође, једињења рутенијума обележена као *NAMI-A* и *KP1019* су показала значајну ефикасност у предклиничким студијама. Рутенијум комплекс обележен као *KP1019* је деловао цитотоксично на примарне туморе, док је *NAMI-A* комплекс свој ефекат испољио инхибирањем ангиогенезе (118, 119).

Истраживања су показала да комплекси злата показују снажну анитуморску активност. Осим тога, комплексни злата се у медицини користе у терапији реуматоидног артритиса. Злато може бити стабилно у различитим оксидационим стањима ($-I$ до $+V$), али се у медицини користи само *Au(I)* и *Au(III)* (120, 121). Показано је да комплекси злата свој анитуморски ефекат испољавају на више начина, везивањем за ДНК молекула, индукцијом апоптозе и инхибицијом ангиогенезе. Једињења злата су показала снажну анитуморску активност *in vitro* и *in vivo*. Анитуморска активност комплекса злата је показана на великом броју ћелијских линија *MDA-MB-231*, *A549*, *D24*, *HT1080*, *PC3 in vitro* (121, 122). Осим тога комплекси злата показују и значајну активност према различитим сојевима бактерија (123, 124).

Бакар је есенцијални елемент за многе биолошке процесе у нашем организму. Бакар је редокс-активни прелазни метал који лако прелази из редукованог Cu^{+} у оксидовано Cu^{2+} оксидационо стање у физиолошким условима. Значајан је за функционисање имунског система, синтезу колагена и продукцију енергије у процесу оксидативне фосфорилације. Такође, неопходан је за апсорпцију гвожђа и одвијање еритропоезе. Бакар је локализован у многим биолошки активним молекулима као што су ензими, протеини и сигнални молекули. Саставна је компонента металоензима (*Cu/Zn* супероксид-дизмутази) који учествују у антиоксидативној заштити (125, 126). Церулоплазмин је протеин који транспортује бакар у крви и има улогу у метаболизму гвожђа. Комплекс на респираторном ланцу цитохромс оксидаза садржи бакар у својој структури и есенцијалан је у процесу ћелијског дисања. Ензим тирозиназа има веома битну улогу у синтези меланина док лизил-оксидаза учествује у формирању везивног ткива, за каталитичку активност ова два ензима неопходно је присуство бакра (3, 127). Повећане концентрације бакра имају токсични ефекат на ћелије и ткива, стога неопходна је прецизна регулација у метаболизму овог метала. Бакар такође показује снажан антибактеријски ефекат и препарати бакра се користе у профилакси и лечењу инфекција рана (3). Поремећај у метаболизму бакра је повезан са растом тумора, ангиогенезом и развојем метастаза. Повећано допремање до малигно трансформисаних ћелија је омогућено захваљујући повећаној експресији специјализованих транспортера за бакар. Такође, студије су показале да смањењем концентрације бакра у канцерској ћелији долази до активације процеса апоптозе. Једињења бакра су показала веома снажан антитуморски ефекат на великом броју ћелијских линја *HCT-116*, *CT-26*, *HCT-15 in vitro* (128). Свој снажан антитуморски ефекат синтетисана једињења бакра су испољила индукцијом апоптозе, застојем ћелијског циклуса и повећаном продукцијом реактивних кисеоничних врста (129, 130).

ЦИСПЛАТИНА

Цисплатина представља хидросолубилни комплекс чију структуру чини платина везана за два атома хлора и две амонијум групе. Овај хидросолубилни комплекс први је синтетисао *M. Peyrone* 1884. године, док је 1960. *Rosenberg* открио инхибиторни ефекат цисплатине на ћелијску пролиферацију. Цисплатина се као хемиотерапеутик користи у терапији карцинома колона, бешике, плућа и тестиса (111).

Цисплатину ћелије преузимају захваљујући *CTR1* транспортеру (енг. *Copper transporter 1*) који је локализован на самој ћелијској мембрани (слика 6). Ћелије које имају повећану експресију овог рецептора могу преузети цисплатину у већој концентрацији и показују већу сензитивност на хемиотерапеутик. Са друге стране, мембрански протеин *TMEM205* (енг. *Transmembrane protein 205*) је повезан са развојем ћелијске резистенције на цисплатину. Истраживања су показала да повећана експресија рецептора *TMEM205* промовише пролиферацију, миграцију и ангиогенезу код карцинома желуца. Стога, овај рецептор може бити потенцијални „*target*“ у терапији цисплатин резистентних тумора како би се повећала сензитивност на овај хемиотерапеутик (131). Даље, студија је показала да смањење експресије *GLUT1* (енг. *Glucose transporter 1*) транспортера је директно повезано са повећаним анти туморским дејством цисплатине. Прецизније, резултати су показали да инхибиција *GLUT1* транспортера у комбинацији са цисплатином може представљати потенцијалну терапију код карцинома сквамозних ћелија једњака (132).

Након преузимања цисплатине, у цитоплазми ћелије долази до дисоцијације атома хлора при чему се на том месту везују молекули воде и овакав активирани комплекс се може везати за молекулу *ДНК*. Прецизније, створени комплекс се ковалентним везама везује за за *N7* молекулу пуринских азотних база, при чему долази до иререверзибилног оштећења молекула *ДНК* и последичне инхибиције процеса транслације и транскрипције (133).

У физиолошким условима продукција реактивних кисеоничних врста је строго контролисана од стране редукваног глутатиона (*GSH*), супероксид димутаза (*SOD*) и каталазе (*CAT*). Уколико се наруши хомеостаза унутар ћелије и дође до повећане продукције реактивних кисеоничних врста, то даље узрокује оштећење многих ћелијских структура као што су протеини, липиди и *ДНК* (134, 135). Канцерске ћелије стварају повећане концентрације реактивних кисеоничних врста у односу на малигно неизмењене ћелије услед онкогене стимулације, повећане метаболичке активности и митохондријалне дисфункције (136). Индукција оксидативног стреса је један од механизма анти туморске активности цисплатине. Примарни „*target*“ цисплатине су митохондрије при чему долази до индукције оксидативног стреса услед редукције митохондријалног мембранског потенцијала. Повећана продукција реактивних кисеоничних врста даље може активирати унутрашњи и спољашњи апоптотски пут (111).

Цисплатина индукује поремећај хомеостазе калцијума унутар ћелије, при чему долази до иницирања липидне пероксидације и инхибиције ензимске активности. Инхибицијом ензимске функције оштећује се митохондријална функција и смањује се синтеза *АТФ-а*. Можемо закључити да нарушавањем хомеостазе калцијума долази до активације апоптозе (111).

Посебан проблем у терапијској примени цисплатине представља чињеница да многе ћелијске компоненте које у својој структури садрже тиол групе

(микрофиламентни пептиди) могу инхибирати антитуморско дејство, па временом малигне ћелије могу постати резистентне на лек (137).

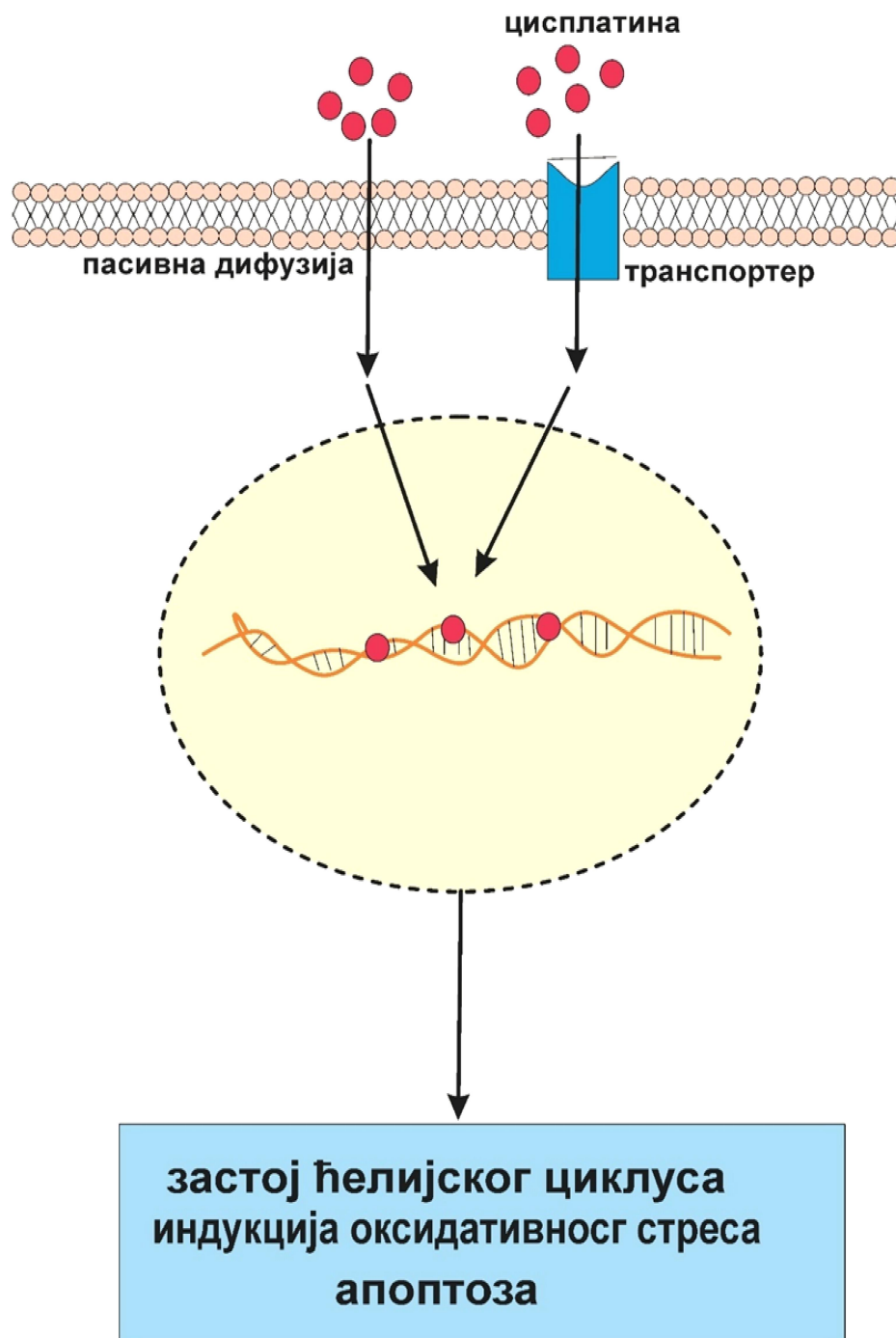
Постоји јасна повезаност дуготрајне примене цисплатине са појавом нежељених ефеката као што су хепатотоксичност, кардиотоксичност, нефротоксичност, отооксичност, мука, гађење и повраћање (138, 139).

Високе дозе цисплатине могу бити узрок оштећења хепатоцита, при чему се сматра да је оксидативни стрес и смањена концентрација редукованог глутатиона главни узрок хепатотоксичности. Елевација хепатичних ензима и билирубина јасно указује на поремећај функције јетре (140).

Кардиотоксичностуслед дуготрајне примене цисплатине је повезана са повећаном продукцијом реактивних кисеоничних врста (липидна пероксидација), оштећењем митохондријалне ДНК, активацијом апоптозе и индукцијом инфламације. Хистолошке промене које се јављају услед цисплатин индиковане кардиотоксичности обухватају некрозу и фиброзу мишиног ткива. Услед оштећења миокарда повећан је степен активности у серуму ензима лактат дехидрогеназе (*LDH*) и киназе (*CK*) (141).

Бубрези могу акумулирати цисплатину у већој мери него други органи, концентрација цисплатине у проксималним тубулима је око пет пута већа од концентрације овог лека у серуму. Елиминација овог лека се одвија путем бубрега гломерулском филтрацијом и тубуларном секрецијом. Стога, у циљу праћења бубрежне функције неопходно је да пацијентима који примају цисплатину одређујемо клиренс креатинина. У циљу превенције нефротоксичности неопходна је адекватна хидратација и одржавање диурезе. Механизам настанка нефротоксичности (акутне бубрежне инсуфицијенције) услед дуготрајне терапије цисплатином обухвата: инхибицију синтезе карнитина, индукцију оксидативног стреса, индукцију инфламације и оштећења крвних судова бубрега (141).

Можемо закључити да је цисплатина веома ефикасна у терапији солидних тумора, а свој антитуморски ефекат постиже активацијом апоптозе, инхибицијом ћелијског циклуса и индукцијом оксидативног стреса.



Слика 6. Антипролиферативни механизам цисплатине

ЛЕКОВИ КОЈИ СЕ КОРИСТЕ У ТЕРАПИЈИ КАНЦЕРА

Већина хемиотерапеутика делује антипролиферативно, оштећујући молекул *ДНК* и иницирајући апоптозу. Међутим, цитотоксични ефекат ови лекови имају и на малигно незмењене ћелије чија је дељење убрзано. Последица овога може бити отежање коштане сржи, успоравање зарастања рана, стерилитет, алопеција, мучнина и повраћање. Антиканцерске лекове смо сврстали у некило основних категорија (142).

1. Аликлирајући агенси
2. Антиметаболити
3. Цитотоксични антибиотици
4. Деривати биљака
5. Хормони

Основна карактеристика алкилирајући агенаса је да сарже у својој структури одржење хемијске групе које имају могућност ковалентног везивања за молекулу *ДНК*. Ефекат стварања ковалентне везе са *ДНК* се огледа у ћелијском застоју у *S* и *G₂* фази ћелијског циклуса, што последично води ка активацији апоптозе. Нежељени дејство ове групе лекова подразумева неселективност, односно алкилирајући агенси супримирају функцију коштане сржи и присутне су гастроинтестинални поремећаји. У ову групу лекова спада циклофосфамид, естрамустин, мелфалан, холрамбурин, ломустин, кармустин, бусуфлфан и цисплатина (142, 143).

Основни лек из групе антиметаболита је метотрексат. У процесу синтезе молекула *ДНК* неопходно је присуство фолата (синтеза пурина). Коензимска форма фолата која је неопходна за синтезу *ДНК* је тетрахидрофолат (*FH₄*). Да би се ова реакција одиграла неопходна је каталитичка активност ензима дихидрофолат редуктазе, при чему за настанак активне коензимске форме *FH₄* неопходна су два кофактора. Метотрексат има могућност интеракције са дихидрофолат редуктазом, при чему инхибира активност овог ензима. Прецизније, усле инхибиције каталитичке активности дихидрофолат редуктазе није могуће синтетисати активну форму фолне киселине *FH₄*. Тиме је спречена синтеза тимидина и стварање молекула *ДНК*. Нежељена дејства лека су поремећај функције коштане сржи и нефротоксичност (142, 143).

Цитотоксични антибиотици имају директан ефекат на *ДНК* молекулу канцерске ћелије. Доксорубин свој антитуморски ефекат остварује везивањем за *ДНК* молекулу, инхибирањем синтезе *РНК* молекула и инхибицијом топоизомеразе II. Степен активности топоизомеразе II је повећан код канцерских ћелија, стога инхибицијом активности овог ензима смањује се и вијабилност ћелија. Нежељена дејства су кардиотоксичност, алопеција и нефротоксичност. Лекови који спадају у групу цитотоксичних антибиотика су доксорубин, идарубин, епирубин и митоксантрон, дактиномицин, блеомицин и прокарбазин (142, 143).

Биљни деривати, винка алкалоиди, таксани, кампотеници имају ефекат на саму функцију тубула и формирање деобног вретена. Винкрестин (винка алкалоид) делује инхибирајући процес митозе у метафази при чему се везује тубулин. Кампотеници свој антипролиферативни ефекат испољавају инхибицијом активности ензима топоизомеразе I. Топоизомераза I је ензим од есенцијалног значаја у подели ћелије. Нежељени ефекти су дијареја и реверзибилна мијелосупресија (142).

Канцер који је настао хормон-сензитивних ткива у одрженом броју случајева може бити хормон-зависни. Спречавање раста тумора може бити индуковано хормонима супротоног деловања или лековима који инхибирају синтезу хормона.

Гликокортиокиди се користе у терапији леукемија и лимфома, тамоксифен код карцинома дојке. Аналоги ослобађајућег хормона за гонадотропине се користе у лечењу малигнитета дојке и простате. У терапији малигнитета простате користе се и антиандрогени (142, 143).

КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА

Откриће паладијума 1803. године од стране хемичара Вилиама Х. Воластона је омогућило детаљније разумевање особина овог метала. Паладијум је метал *VIIIВ* групе са атомским бројем 46. Веома је битна примена паладијума у електроници и стоматологији. Стабилна оксидациона стања овог метала су +2 и +4 (144).

Као прелазни метал паладијум има могућност да гради комплексна једињења, стога, синтетисан је велики број комплекса паладијума са различитим лигандима, а све у циљу испитивања антитуморског ефекта као и селективности потенцијалних хемиотерапеутика (145, 146).

Истраживање спроведено од стране *Zhou* и сарадника је показало да два *Pd(II)* комплекса имају јак антитуморски ефекат на ћелије акутне лимфобластне леукемије *in vitro* (147). Такође, студија је показала да *Pd(II)* комплекс испољава снажнији цитотоксични ефекат него контролни лек цисплатина на неколико ћелијских линија, *A2780* (карцином оваријума) и *HT-29* (колоректални карцином) *in vitro*. (148). Научна студија спроведена од стране *Raković* и сарадника је демонстрирала је да два синтетисана *Pd(II)* комплекса имају јак антитуморски ефекат на *HCT-116* ћелије *in vitro*. Осим тога, претходно поменута једињења паладијума су имала снажан антимикуробни ефекат (149). Даље, студија дизајнирана од стране *Alayyaf* и сарадника демонстрирала је да *Pd(II)* комплекс делује антипролиферативно на ћелије карцинома дојке *MCF-7* (150). Једињења паладијума су снажну цитотоксичну активност демонстрирала на ћелије малигног меланома *Sk-mel*, *SH-4*, *Colo-829* и *C-32* и ћелије канцера дојке *MDA-MB-231*, при чему је показана снажнија антитуморска активност у поређењу са цисплатином (151).

Научна студија *Dutra* је показала да пет *Pd(II)* једињења имају снажан цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* (ћелије карцинома дојке), *SK-BR-3* (ћелије карцинома дојке), *A549* (ћелије карцинома плућа), *A2780* (ћелије карцинома оваријума) и *A2780cis* (цисплатин-резистентни карцином оваријума) (152). Истраживање *Simić* и сарадника је показало да пет синтетисаних *Pd(II)* комплекса демонстрира снажну антипролиферативну активност на ћелије канцера простате *DU-145* и *PC-3*. Такође, ова једињења паладијума су показала висок степен селективности, односно испољила су веома слаб цитотоксични ефекат на мелигно незмењене фибробласте *MRC-5* (87). Студија Јоксимовића и сарадника јасно је доказала да *Pd(II)* једињења имају веома снажан антитуморски ефекат на канцерске ћелије дојке *MDA-MB-231* и грлића материце *HeLa* (153). Једињења паладијума су демонстрирала слабо цитотоксично дејство на *MRC-5* ћелије.

На основу претходно наведених студија можемо закључити да на великом броју ћелијских линија различити паладијум комплекси поседују антитуморски ефекат. Овај ефекат постижу активацијом спољашњег и унутрашњег апоптотског пута, застојем у *S*, *G₂* фази ћелијског циклуса, повећаном продукцијом реактивних кисеоничних врста (индукција оксидативног стреса) и инхибицијом експресије *EGFR* (енг. *epidermal growth factor receptor*) (146).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ

Циљеви нашег истраживања су подразумевали:

1. Дефинисање антипролиферативног дејства три синтетисана $Pd(II)$ комплекса која смо обележили као $Pd1(C_{28}H_{24}N_2O_4Pd)$, $Pd2(C_{30}H_{28}N_2O_4Pd)$ и $Pd3(C_{34}H_{30}N_4O_2Pd)$ на ћелије:
 - а) *DU-145*- ћелијска линија карцинома простате
 - б) *PC-3*- ћелијска линија карцинома простате
 - в) *MRC-5*- ћелијска линија фибробласта.
2. Детекција канцерских ћелија у фазама ћелијске смрти, некрозе и апоптозе након третмана одговарајућим $Pd(II)$ једињењима.
3. Дефинисање утицаја $Pd1(C_{28}H_{24}N_2O_4Pd)$, $Pd2(C_{30}H_{28}N_2O_4Pd)$ и $Pd3(C_{34}H_{30}N_4O_2Pd)$ једињења на концентрацију *Bax* (проапоптотичног) и *Bcl-2* (антиапоптотичног) молекула.
4. Испитивање ефекта $Pd(II)$ једињења на активирање ефекторске каспазе-3 унутар ћелија.
5. Тестирање дејства $Pd(II)$ једињења на одвијање ћелијског циклуса малигно измењених ћелија.
6. Утврђивање да ли $Pd(II)$ једињења имају антиметастатски ефекат на малигне ћелије карцинома простате.

Хипотезе студије су следеће:

- Новосинтетисана паладијума(II) једињења демонстрирају снажан антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате *DU-145* и *PC-3*.
- Тестирана паладијума(II) једињења демонстрирају слаб антипролиферативни ефекат на ћелије фибробласта *MRC5*.
- Новосинтетисана паладијума(II) једињења показују висок степен селективности, односно имају сигнификантни антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате *DU-145* и *PC-3* који је условљениндукцијом апоптозе.
- Апоптоза малигних ћелија условљена је променом односа активног проапоптотског молекула *Bax* и антиапоптотског молекула *Bcl-2*.
- Апоптоза туморских ћелија је каспаза-зависна, односно долази до повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију на активну каспазу-3.
- Новосинтетисана једињења паладијума(II) делују делују антиметастатски на туморске ћелије карцинома простате.
- Испитивани комплекси паладијума(II) успоравају пролиферацију туморских ћелија индукцијом застоја у ћелијском циклусу.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је спроведено као експериментална студија *in vitro*. За потребе експеримената користили смо хумане ћелијске линије које су доступне истраживачима из целог света. Ћелијске линије које смо у експериментима користили су:

- PC-3
- DU-145 и
- MRC-5

Ћелијска линија PC-3 је изолована из метастатске промене у костима 62-годишњег пацијента са аденокарциномом простате градуса IV.

Ћелијска линија DU-145 је изолована из метастатских промена у ЦНС-у 69-годишњег пацијента са канцером простате.

Ћелијска линија PC-3 је добијена захваљујући љубазности проф. др Срећка Трифуновића са Природно-Математичког Факултета.

Ћелијска линија DU-145 је купљена захваљујући одобрењу јуниор пројекта Факултета медицинских наука ЈП 12/19.

Ћелијске линије су након протокола одмрзавања пребациване у стерилне флашкове намењене за ћелијске културе запремине 25 cm³. Након тога, флашкови са ћелијским културама су остављани у инкубатор у коме је присутна апсолутна влажност и 5% CO₂, чиме су испуњени услови за раст исшитиваних ћелија. Осим тога, температура у инкубатору је била константна и износила је 37°C.

За раст и одржавање тестираних ћелијских линија користили смо комплетни медијум који је припреман према упутству произвођача (*ATCC, American Type Culture Collection*).

Култивација ћелија унутар флашка је омогућена до 90% конфлуентности, а затим је извођено ћелијско расејавање. Веома је битна чињеница да су предвиђени експерименти обављани искључиво у фази када долази до експоненцијалног раста ћелија са три узастопна понављања. Оваква поставка омогућава саму валидност резултата. Већина реагенса које смо употребили у нашој студији су добијени од стране Сигме (*Sigma, Germany*).

Експерименти који су укључивали ћелијске линије су извођени у стерилним условима у ламинарној комори са вертикалним протоком ваздуха.

Коришћена једињења која смо означили као Pd1(C₂₈H₂₄N₂O₄Pd), Pd2(C₃₀H₂₈N₂O₄Pd) и Pd3(C₃₄H₃₀N₄O₂Pd) су синтетисана на Природно-математичком факултету од стране проф. др Марине Костић.

Када је дефинисана структура ова три Pd(II) једињења од стране проф. др Марине Костић, добијена количина је износила по 15mg и са том мером је рађено антипролиферативно дејство на ћелијске културе карцинома простате и на контролне фибробласте *in vitro*. Синтетисане комплексе смо растварали у диметилсулфоксиду (*DMSO, dimethylsulfoxide*), према препоруци истраживача са Природно-математичког факултета. Једињења паладијума смо растварали у диметилсулфоксиду непосредно пред сам експеримент, али је веома битна чињеница да концентрација DMSO-а није

прелазила 0,05% *v/v*. Тиме је практично спречена могућност антипролиферативног ефекта самог диметилсулфоксида.

ИСТРАЖИВАЧКЕ ВАРИЈАБЛЕ

Независне варијабле (узрок) наше студије су представљала три тестирана једињења паладијума обечежена као $Pd1(C_{28}H_{24}N_2O_4Pd)$, $Pd2(C_{30}H_{28}N_2O_4Pd)$ и $Pd3(C_{34}H_{30}N_4O_2Pd)$, док су антипролиферативна активност, програмирана ћелијска смрт, ћелијски циклус представљале зависне варијабле (исход) нашег истраживања.

ТЕСТ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МТТ

Након што смо третирали испитиване ћелије паладијум једињењима у *in vitro* условима, антипролиферативна активност потенцијалних хемиотерапеутика је доказивана коришћењем МТТ-теста.

Овим тестом се мери стопа преживљавања, односно метаболичка активност ћелија. Прецизније, детектујемо активност $NAD(P)H$ -зависне оксидоредуктазе која је активна у живим ћелијама. Претходно поменути $NAD(P)H$ -зависна оксидоредуктаза може индуковати редукцију жутог раствора тетразолијум-бромида $5mg/ml$ *PBS*-а у формазан, који је љубичасте боје. Уколико је $NAD(P)H$ -зависна оксидоредуктаза активнија, постоји јасна индикација да је присутно више вијабилних ћелија. Да би се одрадила адекватна анализа неопходно је присуство контролне популације ћелија које нису третиране паладијум једињењима, већ само култивисане у медијуму.

Антипролиферативни ефекат који је тестиран на ћелије карцинома простате *PC-3* и *DU-145* и на фибробласте *MRC5* је детектован у три временска интервала 24, 48 и 72 сата. Концентрације тестираних паладијум једињења $Pd1$, $Pd2$ и $Pd3$ су износиле од $0,1\mu M$ до $100\mu M$. Осим тога, тестиран је антипролиферативни ефекат цисплатине у истим моларним вредностима, а овај лек је представљао позитивну контролу у нашој студији.

Приближно око 5000 тестираних ћелија су засејаване у бунаре микротитар плоча од 96 бунара. Затим су ћелије остављане 24 сата у инкубатору како би се омогућило њихово везивање за микротитар плоче. Након тога, уследило је третирање ћелија синтетисаним паладијум једињењима чија је концентрација износила од $0,1\mu M$ до $100\mu M$. Третирање ћелија петходно поменути концентрацијама комплекса је рађено у трипликату. Третман испитиваним супстанцама је трајао 24, 48 или 72 сата, а након тога би се одлагао супернатант и додао 10%-ни раствор тетразолијум-бромида у *PBS*-у од $0,5mg/ml$. Преосталих 90% овог раствора је чинио чист медијум без серума. Након 2 сата раста у условима *in vitro* ћелија у оваквом раствору у инкубатору на $37^\circ C$ и 5% CO_2 , поново би се подизао супернатант и додало би се по $200\mu L$ *DMSO*-а у сваки бунарчић микротитар плоче. Плоче би се лагано промешале, да би се растворили кристали формазана у *DMSO*-у и апсорбанца би се читавала на *ELISA*-читачу у року од највише 30 минута. Мерили смо апсорбанцу на $595 nm$. Након тога смо рачунали стопу преживљавања ћелија по следећој формули

$$V = (ABS_t - Blank) * 100 / (ABS_k - Blank),$$

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

Вредност цитотоксичности смо рачунали по формули:

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

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

На основу претходно детектованих резултата имали смо могућност израчунавања IC_{50} вредности односно вредност половине максималне инхибиторне моларне концентрације. Вредност је детектована користећи линеарну или логаритамску регресију зависно од типа биолошког одговора на једињење и уз помоћ програма *Microsoft Office Excel*-а 2016.

ДЕТЕКЦИЈА АПОПТОЗЕ ANNEXIN V/PI ТЕСТ

Након детекције антипролиферативног ефекта $Pd1$, $Pd2$ и $Pd3$ једињења, наредни корак у нашој студији је подразумевао дефинисање начина анитуморског дејства на $PC-3$ и $DU-145$ ћелије. Прецизније, одређиван је релативни однос ћелија у апоптози и некрози уз коришћење *Annexin V/PI* теста, мерењем проточном цитометријом.

Принцип овог теста подразумева двоструко бојење ћелија које смо у претходном кораку третирали IC_{50} вредностима паладијум једињења. Ако имамо у виду да смо третирали IC_{50} вредностима $PC-3$ и $DU-145$ ћелије, можемо да очекујемо да ће око половина популације ћелија бити вијабилно. Када се процес апоптозе активира у ћелији, остаци фосфатидил-серина се окрећу ка спољашњој страни, а управо за фосфатидил-серин се везује анексин (*Annexin V*). Стога, јасно је да ћелије код којих се одиграва процес апоптозе су анексин позитивне (било да се ради о раној или касној апоптози). У циљу детекције апоптотичних ћелија путем проточне цитометрије за анексин се везује флуоресцеин-изотиоцијанат (*FITC*). Пропиридијум-јодид има могућност везивања за једру, међутим ћелије које садрже интактну плазма мембрану не везују пропиридијум-јодид.

За извођење експеримента смо користили *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (*BD Biosciences*).

После третирања ћелија IC_{50} вредностима паладијум једињењима, подигли смо ћелије, а након тога су испране у ледено хладном PBS -у и затим растворене у пуферу за везивање ћелија (*Binding buffer*) у концентрацији од 10^6 ћелија/ mL . Следећи корак је подразумевао пребацивање $100 mL$ суспензије ћелија у по три епрувете запремине $5 mL$. Након тога, свакој епрувети смо додали $5 mL$ анексина и $5 mL$ пропиридијум-јодида (PI). Затим смо вортексовали ћелије и додали $400 mL$ пуфера за везивање ћелија. Последњи корак је подразумевао детекцију резултата на проточном цитометру.

Детектоване резултате смо обрадили и презентовали уз употребу програма за проточну цитометрију *FlowJo Vx*.

Уколико су детектоване ћелије анексин негативне и пропидијум-јодид негативне јасно је да се ради о живим, вијабилним ћелијама. Анексин позитивне и пропидијум-јодид негативне ћелије када се детектују налазе се у стадијуму ране апоптозе, док у стадијуму касне апоптозе се детектују анексин позитивне и пропидијум-јодид позитивне ћелије. Некротичне ћелије су анексин негативне и пропидијум-јодид позитивне ћелије.

ДЕТЕКЦИЈА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Након детекције апоптозе и некрозе, проучавали смо утицај паладијум једињења на ћелијски циклус *PC-3* и *DU-145* ћелија у *in vitro* условима. Циљ је био детекција успоравања ћелијске деобе након третмана *Pd1*, *Pd2* и *Pd3*.

Стадијуме ћелијске деобе смо детектовали применом *PI* бојења и мерењем тог односа проточном цитометријом.

Принцип овог теста подразумева способност везивања пропидијум-јодидаза молекула *ДНК*. Интензитет флуоресценције коју емитује пропидијум-јодид нам омогућава да у свакој ћелији дефинишемо јасно фазу ћелијског циклуса.

Након третмана тестираних канцерских ћелија IC_{50} вредностима паладијум једињења ћелије смо трипсинизовали и једном опрали медијумом и два пута фосфатним пуфером. Потом смо ћелије фиксирали ледено хладним 70%-им етанолом и држали их у етанолу на 4°C најмање 1 сат (у просеку смо их држали 20-ак часова).

Тако фиксиране ћелије бисмо следећег дана два пута опрали у ледено хладном фосфатном пуферу, додали 100 $\mu\text{g/ml}$ *RNase* и 200 μl раствора пропидијум-јодида. Након раста у условима *in vitro* у мраку на собној температури од 30 минута, додали бисмо још 300 μl фосфатног пуфера и читавали смо резултате на проточном цитометру.

Резултати су касније обрађени и презентовани коришћењем програма за проточну цитометрију *FlowJo V10*.

ДЕТЕКЦИЈА МОЛЕКУЛА АПОПТОЗЕ

Након проучавања дејства комплекса палдијума на ћелијски циклус, у следећем кораку смо дефинисали да ли паладијум једињења активирају спољашњи или унутрашњи апоптотски пут. Стога, мерена је концентрација регулаторних протеина у апоптотоском процесу. Анализа есенцијалних протеина порграмиране ћелијске смрти је рађена на *DU-145* ћелијској линији. Разлог лежи у томе што су тестирана *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* једињења демонстрирала снажнији антипролиферативни ефекат на *DU-145* у односу на *PC-3* ћелије. Мерени протеини у овом експерименту су проапоптотични молекул *Bax* антиапоптотскимолекул *Bcl-2*. Осим тога, рађена је детекција ћелија у којима је присутна активна каспаза-3.

Реагенсе које смо користили у овим експериментима су били следећи:

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

Првих корак је обухвати третман испитиваних *DU-145* ћелија *IC₅₀* вредностима сва три паладијум једињења. Након тога смо ћелије трипсинизовали и једном опрали медијумом и два пута ледено хладним фосфатним пуфером. После саме фиксације и пермеабилizације неспецифично везивање антитела смо блокирали додавањем козјег серума. У следећем кораку смо додавали примарно и секундарно обележено антитело.

Након тога, у условима *in vitro* у мраку од 30 минута на собној температури, додавано је 300 μ l фосфатног пуфера. Детектовани резултати су очитани на проточном цитометру.

Мерење просечног интензитета флуоресценције (*Mean Fluorescence Intensity - MFI*) за молекуле *Bax* и *Bcl-2* је вршено израчунавањем односа интензитета флуоресценције мереног молекула (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле.

Детекција активне каспазе-3 на тестираним ћелијама *DU-145* је спроведена тако што смо мерили проценат ћелија које испољавају флуоресценцију.

Резултати су касније обрађени и презентовани коришћењем програма за проточну цитометрију *FlowJo VX*.

АНАЛИЗА АНТИМЕТАСТАТСКОГ ПОТЕНЦИЈАЛА

Један од важних одговора који желимо да добијемо приликом тестирања антитуморске активности сваког новосинтетисаног комплекса метала је и његово антиметастатско дејство. Веома је важно да поред „директног“ токсичног дејства на туморске ћелије које комплекси метала најчешће показују, ова једињења имају и могућност да умање могућност или да чак потпуно спрече појаву удаљених метастаза. Овакве способности комплекса могу бити последица чињенице да туморске ћелије показују генерално висок степен резистентности према различитим агенсима. Цисплатина може фантастично деловати иницијално, уништити директно највећи број туморских ћелија, али оне ћелије које преживе, често дају метастазе које су касније резистентне на нови циклус терапије цисплатином.

Управо је ова чињеница један од главних разлога зашто се континуирано истражују нова антитуморска једињења, а нарочито, зашто испитујемо дејство такозваних субтерапијских доза потенцијалних цитостатика на туморске ћелије.

Антиметастатски потенцијал се испитује клоногеним тестом *in vitro*. Он се заснива на третману јако ниским дозама лека који траје релативно дуго. Конкретно, ми смо испитивали дејство новосинтетисаних комплекса паладијума на туморске DU-145 ћелије. Ћелије су култивисане на уобичајен начин у комплетном медијуму на 37 °C у апсолутној влажности и са 5% CO₂. Након постизања експоненцијалне фазе раста, ћелије су подигнуте трипсином, избројане и ресуспендоване у одговарајућој концентрацији од 100 ћелија на 3 милилитра медијума. Затим је по 100 ћелија (односно по 3 ml суспензије DU-145 ћелија засејавано у плоче са 6 бунара које су стављане у инкубатор. Следећег дана, након бројања и записивања броја „залепљених“ ћелија, односно броја ћелија које су успешно пребачене и остале вијабилне у плочи са 6 бунара, у бунаре је додавано по 1ml чистог комплетног медијума или 1ml одговарајућег комплекса паладијума, тако да би финалне концентрације сва три комплекса износиле 0.1 μM, 0.3 μM, 1 μM и 10 μM. Сви експерименти су рађени у три понављања. Након две недеље, подигнут је медијум, ћелије су фиксиране и обојене, а потом је избројан број колонија које су појединачне туморске ћелије формирале након две недеље. Сви апсолутни бројеви су онда искоришћени да би се направио релативни број за сваку испитивану концентрацију комплекса, односно, фракција преживљавања (енг. survival fraction, SF). Ова вредност је израчуната по следећој формули:

Фракција преживљавања = број формираних колонија након две недеље култивације / број иницијално залепљених ћелија након 24 часа

Све бројчане вредности за сваку испитивану концентрацију су добијене као аритметичка средина за три независна експеримента ± стандардна девијација.

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати научног рада су обухватили дефинисање антитуморских ефеката три новосинтетисана једињења палладијума која смо обележили као $Pd1(C_{28}H_{24}N_2O_4Pd)$, $Pd2(C_{30}H_{28}N_2O_4Pd)$ и $Pd3(C_{34}H_{30}N_4O_2Pd)$ на ћелије карцинома простате PC-3 и DU-145.

Због структурне аналогије и клиничке примене тестиран је и антипролиферативни ефекат цисплатине на малигне ћелије PC-3 и DU-145. Сама антипролиферативна активност палладијум једињења и цисплатине одређивана је у различитим концентрацијама и у три временска интервала. Цитотоксични ефекат је дефинисан применом *MTT* теста.

АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА PC-3 ЋЕЛИЈЕ НАКОН 24 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ

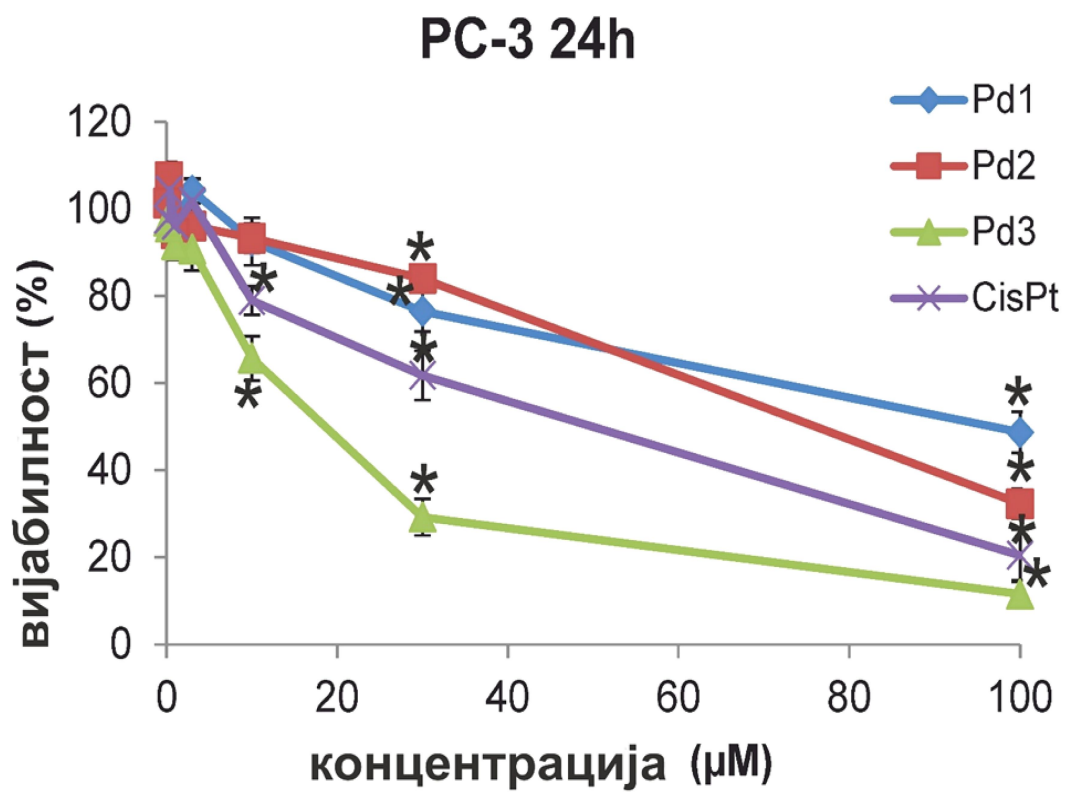
Добијени резултати су демонстрирали да применом $Pd1$ једињења у концентрацији од $30\mu M$ долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта на PC-3 ћелије након 24-часовног инкубационог периода ($p < 0,05$, графикон 1). Прецизније, измерена вијабилност канцерских ћелија је износила $76,2 \pm 2,7\%$. Такође, сигнификантно антипролиферативно дејствоје показано и у концентрацији $Pd1$ комплекса од $100\mu M$ ($48,7 \pm 4,7\%$). Треба напоменути да у концентрацијама $Pd1$ једињења нижим од $30\mu M$ није дошло до сигнификантног антипролиферативног ефекта на малигне ћелије PC-3 ($p > 0,05$, графикон 1).

Резултати студије су потврдили да је након третмана $Pd2$ једињења у концентрацији од $30\mu M$ дошло до статистички значајаног антипролиферативног ефекта на PC-3 ћелије ($p < 0,05$, графикон 1). Измерена вијабилност канцерских ћелија за концентрацију од $30\mu M$ је износила $84,1 \pm 2,4\%$. Исто тако, при већој концентрацији $Pd2$ једињења ($100\mu M$) показан је сигнификантни антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате ($p < 0,05$, графикон 1). Осим тога, у концентрацијама од $10\mu M$, $3\mu M$, $1\mu M$, $0,3\mu M$ није дошло до снажног антипролиферативног ефекта на PC-3 ћелије.

Након 24-часовног третмана PC-3 ћелија $Pd3$ једињењем у концентрацији од $10\mu M$ демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат, где је вијабилност измерена $65,7 \pm 4,1\%$ ($p < 0,05$, графикон 1). Када говоримо о вишим концентрацијама $Pd3$ комплекса демонстриран је статистички значајан антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате ($p < 0,05$, графикон 1). Насупрот томе, при нижим концентрацијама $Pd3$ једињења $3\mu M$, $1\mu M$ и $0,3\mu M$ демонстриран је веома слаб антитуморски ефекат, односно не долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта на канцерске ћелије ($p < 0,05$, графикон 1).

После третирања цисплатином (24-часовна инкубација) на PC-3 ћелије до сигнификантног антипролиферативног дејства дошло је при концентрацији од $10\mu M$, а измерена је вијабилност $78,8 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 1). Такође, при концентрацијама цисплатине од $30\mu M$ и $100\mu M$ демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 1). Међутим, при концентрацијама $3\mu M$, $1\mu M$ и $0,3\mu M$ није демонстриран сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 1).

На основу претходних података јасно можемо закључити да након 24-часовног третмана PC-3 ћелија сва тестирана једињења $Pd1$, $Pd2$ и $Pd3$ и цисплатина испољавају снажан антипролиферативни ефекат.



Графикон 1. Антитуморско дејство паладијум једињења након 24 часа инкубације

АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА РС-3 ЋЕЛИЈЕ НАКОН 48 ЧАСОВА ИНКУБАЦИЈЕ

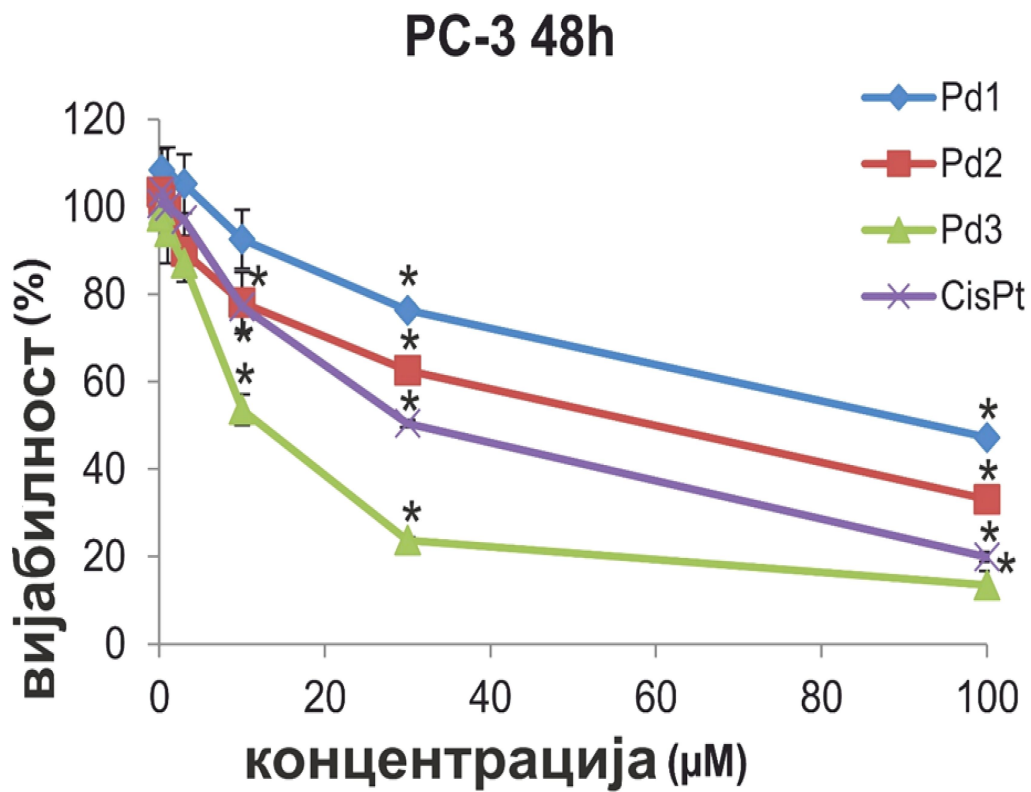
Након 48-часовне инкубације резултати су демонстрирали да *Pd1* једињење у концентрацији од $30\mu\text{M}$ индукује сигнификантни антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије ($p < 0,05$, графикон 2). Прецизније, при концентрацији паладијум једињења од $30\mu\text{M}$ измерена је вијабилност малигнућ ћелија од $74,3 \pm 1,4\%$. Сигнификантни антипролиферативни ефекат на РС-3 ћелије је демонстриран и при концентрацији од $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). При моларним вредностима *Pd1* комплекса од $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$ и $10\mu\text{M}$ није показан сигнификантни антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије простате ($p > 0,05$, графикон 2).

Тестирањем антитуморског ефекта *Pd2* (48-часовна инкубација) једињења демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат на РС-3 ћелије при концентрацији од $10\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Вијабилност канцерских ћелија при овој концентрацији комплекса је износила $78,1 \pm 3,1\%$. Такође, при концентрацијама $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигне ћелије ($p < 0,05$, графикон 2). Међутим, када говоримо о концентрацијама $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$ и $10\mu\text{M}$ није демонстриран сигнификантни антипролиферативни ефекат на РС-3 ћелије ($p > 0,05$, графикон 2).

При испитиваним моларностима *Pd3* једињења након 48-часовне инкубације при концентрацији од $10\mu\text{M}$ показан је сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигне ћелије ($p < 0,05$, графикон 2). При концентрацијама лека $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ такође је дошло до снажног антитуморског ефекта на РС-3 ћелије ($p < 0,05$, графикон 2). Када говоримо о нижим концентрацијама од $10\mu\text{M}$, демонстриран је слаб антиканцерски ефекат односно није показан сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 2).

Тестирањем антитуморског дејства цисплатине након 48-часовне инкубације при концентрацији од $10\mu\text{M}$ показан је сигнификантни антипролиферативни ефекат на РС-3 ћелије, при чему је израчуната вијабилност $77,1 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$, графикон 2). При вишим моларностима ($30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$) резултати су указали да је дошло до сигнификантног антитуморског ефекта на малигну измењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 2). Насупрот томе, када говоримо о концентрацијама $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$ и $10\mu\text{M}$ резултати јасно показују да није демонстриран сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 2).

Можемо јасно закључити да након 48-часовне инкубације тестирани комплекски испољавају снажан антитуморски ефекат на ћелије аденокарцинома простате.



Графикон 2. Антитуморско дејство паладијум једињења након 48 часова инкубације

АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА РС-3 ЋЕЛИЈЕ НАКОН 72 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ

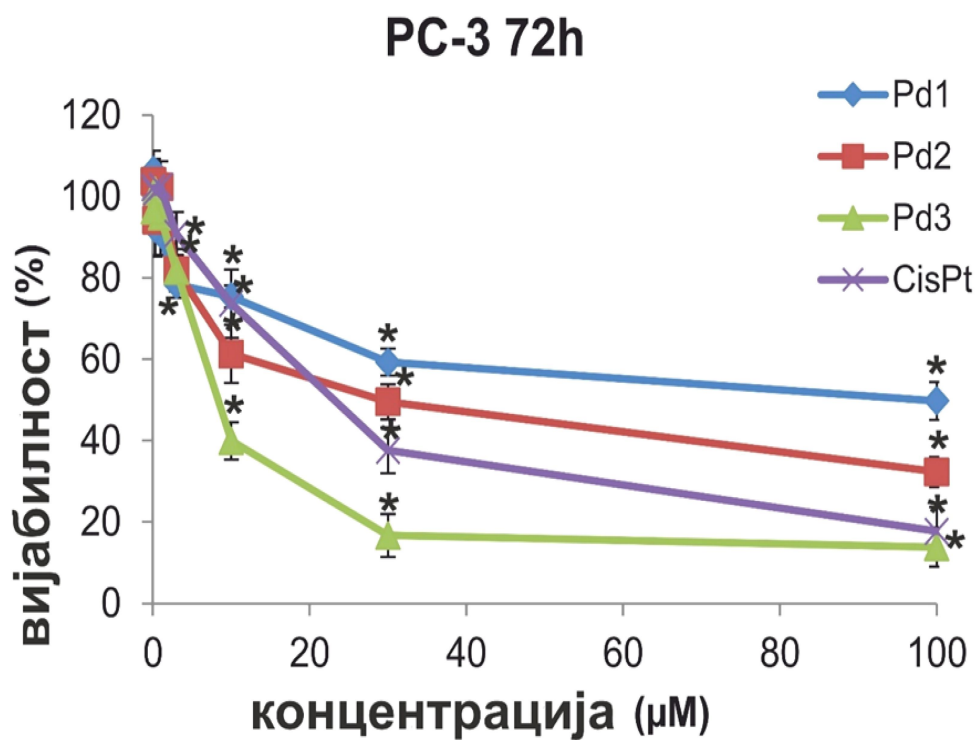
Када смо тестирали цитотоксични ефекат *Pd1* једињења након 72-часова инкубације, резултати су указали да при концентрацији од $3\mu\text{M}$ долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта на РС-3 ћелије ($p < 0,05$, графикон 3). Такође, при вишим концентрацијама *Pd1* ($10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$) показан је сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигне ћелије ($p < 0,05$, графикон 3). Након култивације канцерских ћелија *Pd1* једињењем у концентрацијама $0,3\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$ није показан сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 3).

Испитивањем антитуморског ефекта *Pd2* једињења (након 72-часова инкубације) демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат при концентрацији од $3\mu\text{M}$, при чему је вијабилност износила $81,8 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$, графикон 3). Када говоримо о вишим концентрацијама такође је показан сигнификантни антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије ($p < 0,05$, графикон 3). Насупрот томе, при концентрацијама *Pd2* једињења од $0,3\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$ није показан сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 3).

Након 72-часова инкубације концентрације *Pd3* једињења од $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ су демонстрирале сигнификантни антипролиферативни ефекат на РС-3 ћелије ($p < 0,05$, графикон 3). Када говоримо о нижим концентрацијама $0,3\mu\text{M}$ и $1\mu\text{M}$ резултати су демонстрирали да није дошло до статистички значајног антипролиферативног ефекта на малигну измењене ћелије ($p > 0,05$, графикон 3).

Утврђивањем антитуморског ефекта цисплатине, резултати су демонстрирали да при концентрацији од $10\mu\text{M}$ долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта на канцерске ћелије ($p < 0,05$, графикон 3). При вишим концентрацијама лека такође је показан сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 3). Насупрот томе, при концентрацијама нижим од $10\mu\text{M}$ није демонстриран сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 3).

На основу претходно поменутих података јасно је да су тестирана једињења показала снажан антитуморски ефекат на РС-3 ћелије, што се може доказати и израчунатим IC_{50} вредностима (табела 1).



Графикон 3. Антитуморски ефекат паладијум једињења након 72 часа инкубације

PC-3

<i>IC</i> ₅₀ (μM)	Pd1	Pd2	Pd3	cisplatin
72h	79.3±7	29.1±2	8.6±0.9	29.7 ± 3
48h	89.9±8	58.6±5	12.5±1	21.9 ± 2
24h	94.1±9	75.2±7	38.4±3	15.6 ± 1

Табела 1. IC50 вредности

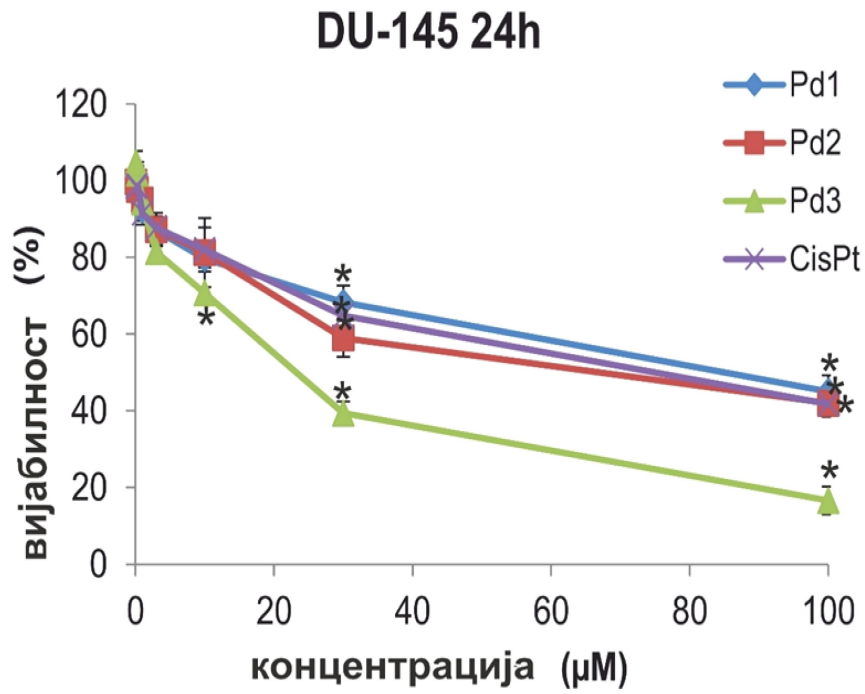
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА *DU-145* ЋЕЛИЈЕ НАКОН 24 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ

Наша студија је демонстрирала да након примене једињења *Pd1* долази до индукције статистички значајног антипролиферативног ефекта већ при моларности од $30\mu\text{M}$. Израчуната вијабилност малигнух ћелија *DU-145* је износила $68,2\% \pm 3,8\%$ ($p < 0,05$, графикон 4). Осим тога, при концентрацији паладијум комплекса од $100\mu\text{M}$ демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 4). Када говоримо о концентрацијама *Pd1* једињења нижим од $30\mu\text{M}$ није детектована сигнификантна антипролиферативна активност на ћелије карцинома простате ($p > 0,05$, графикон 4).

Након што је тестиран ефекат *Pd2* једињења детективан је сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије при концентрацијама од $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 4). Када говоримо о моларности $30\mu\text{M}$ вијабилност је износила $58,9 \pm 4,8\%$, док је за концентрацију *Pd2* једињења од $100\mu\text{M}$ вијабилност износила $41,9 \pm 3,4\%$. Међутим, након примене *Pd2* једињења у концентрацијама нижим од $30\mu\text{M}$ није детектована сигнификантна антипролиферативна активност на ћелије карцинома простате ($p > 0,05$, графикон 4).

Тестиран антитуморски ефекат *Pd3* једињења је показао да при моларности од $10\mu\text{M}$ долази до сигнификантне антипролиферативне активности на *DU-145* ћелије ($p < 0,05$, графикон ЦЦ). При концентрацијама од $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ паладијум комплекса такође је детектована сигнификантна антипролиферативна активност ($p < 0,05$, графикон 4). Супротно, при моларним концентрацијама *Pd3* једињења од $3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $0,3\mu\text{M}$ није детектовано сигнификантно умањење вијабилности канцерских ћелија ($p > 0,05$, графикон 4).

Испитиван цитотоксични ефекат цисплатине на ћелије карцинома простате је демонстрирао је да при моларности од $30\mu\text{M}$ долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта, при чему је вијабилност износила $64,8 \pm 4,3\%$. При максималној моларности од $100\mu\text{M}$ демонстриран је сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије ($p < 0,05$, графикон 4). Даље, при моларностима нижим од $30\mu\text{M}$ није демонстриран сигнификантни антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије ($p > 0,05$, графикон 4).



Графикон 4. Антитуморски ефекат паладијум једињења након 24 часа инкубације

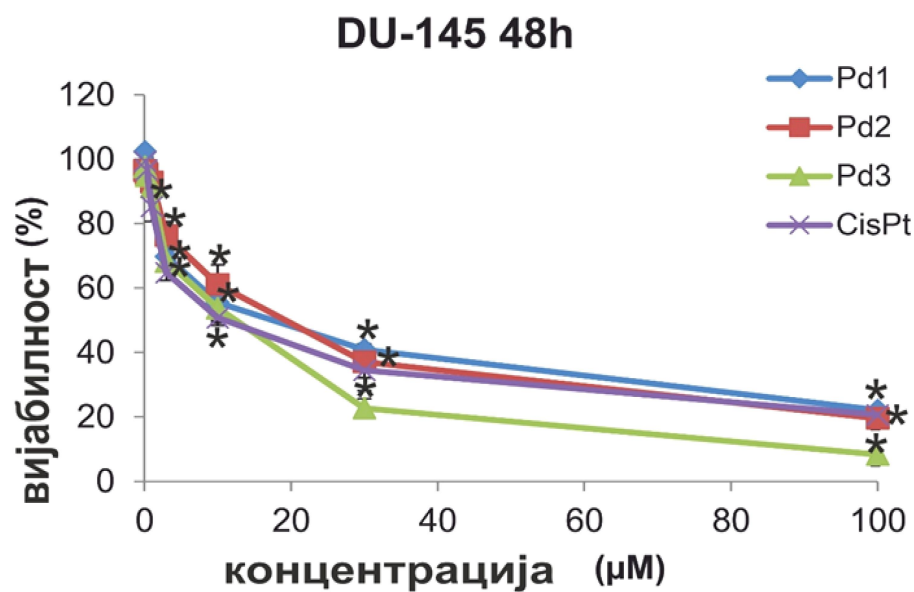
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА *DU-145* ЋЕЛИЈЕ НАКОН 48 ЧАСОВА ИНКУБАЦИЈЕ

Утврђивањем цитотоксичног дејства *Pd1* детектовано је да при моларној концентрацији од $3\mu\text{M}$ долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта на ћелије карцинома простате ($p < 0,05$, графикон 5). Прецизније, при моларности од $3\mu\text{M}$ вијабилност *DU-145* ћелија је износила $69,8 \pm 2,9\%$. При моларностима од $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$ детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат *Pd1* једињења на малигно измењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 5). Осим тога, при концентрацијама паладијум једињења од $0,3\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$ и $3\mu\text{M}$, није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелија након 48 часова инкубације ($p > 0,05$, графикон 5).

Применом *Pd2* једињења у моларностима од $3\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$, након 48 часова инкубације, детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на тестиране *DU-145* ћелије ($p < 0,05$, графикон 5). Даље, при моларностима комплекса паладијума нижим од $3\mu\text{M}$ није показано сигнификантно антипролиферативно дејство на малигно трансформисане ћелије ($p > 0,05$, графикон 5).

Након третирања *DU-145* ћелија *Pd3* једињењем у моларној концентрацији од $3\mu\text{M}$ детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат, при чему је вијабилност млаингних ћелија износила $68,2 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). Када говоримо о вишим концентрацијама комплекса палдијума демостриран је даљи антипролиферативни ефекат *DU-145* ћелија ($p < 0,05$, графикон 5). Није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат *Pd3* једињења на канцерске ћелије при концентрацијама нижим од $3\mu\text{M}$ ($p > 0,05$, графикон 5).

Приликом 48-часовног третмана цисплатом у концентрацији од $3\mu\text{M}$ детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије, при чему је вијабилност износила $64,4 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). Применом виших концентрација једињења паладијума такође је детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигно измењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 5). При нижим вредностима цисплатине није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије након 48 часова култивације ($p > 0,05$, графикон 5).



Графикон 5. Антитуморски ефекат паладијум једињења након 48 часова инкубације

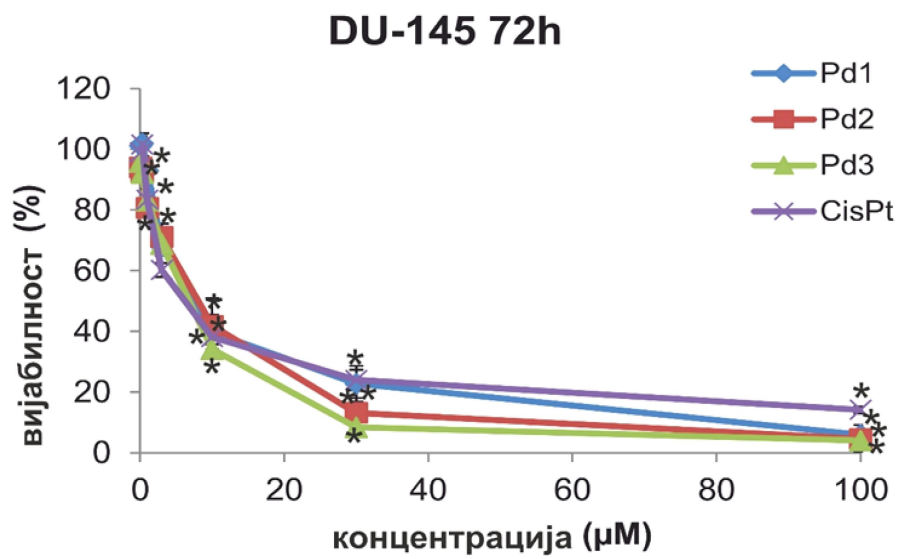
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА *DU-145* ЋЕЛИЈЕ НАКОН 72 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ

Након тестираног антитуморског ефекта *Pd1* једињења при моларности од $3\mu\text{M}$ детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије при чему је вијаблност износила $67,9\pm 2,9\%$ ($p < 0,05$, графикон 6). При вишим концентрацијама комплекса паладијума такође је забележен сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигно измењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 6). Међутим када се *Pd1* једињење тестира у нижим моларностима од $3\mu\text{M}$ не долази до сигнификантне антипролиферативне активности на ћелије карцинома прстате ($p > 0,05$, графикон 6).

Испитивани антитуморски ефекат *Pd2* једињења на *DU-145* ћелије је демонстрирао да већ при концентрацији од $1\mu\text{M}$ долази до сигнификантног антипролиферативног ефекта након 72 часа инкубације ($p < 0,05$, графикон 6). Такође, при вишим моларностима детектоваан је сигнификантни антипролиферативни ефекат комплекса паладијума на малигно измењене ћелије ($p < 0,05$, графикон 6). Даље треба напоменути да при вредностима *Pd2* једињења нижим од $1\mu\text{M}$ није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије ($p > 0,05$, графикон 6).

Тестирано једињење *Pd3* је демонстрирало снажан антитуморско ефекат, односно сигнификантни антипролиферативни ефекат је детектован при концентрацији од $1\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон ЦЦ). При вишим вредностима паладијум једињења такође је детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије ($p < 0,05$, графикон ЦЦ). Осим тога, при концентрацијама нижим од $1\mu\text{M}$ није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 6).

Након 72-часо инкубационог периода *DU-145* ћелија при вредностима цисплатине од $1\mu\text{M}$ до $100\mu\text{M}$ детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на тестиране *DU-145* ћелије ($p < 0,05$, графикон 6). При вредностима цисплатине од $1\mu\text{M}$ није показана снажна антитуморска активност комплекса палдијума. Прецизније, није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате ($p > 0,05$, графикон 6).



Графикон 6. Антитуморски ефекат паладијум једињења након 72 часа инкубације

Du-145

<i>IC</i> ₅₀ (μM)	Pd1	Pd2	Pd3	cisplatin
72h	9.3 ± 0.9	8.7 ± 0.8	7.1 ± 0.8	8.2 ± 0.8
48h	17.5 ± 1	19.2 ± 2	11.0 ± 1	11.4 ± 1
24h	83.6 ± 9	75.9 ± 7	48.4 ± 5	22.3 ± 2

Табела 2. IC50 вредности

АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА MRC5 ЋЕЛИЈЕ НАКОН 24 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ

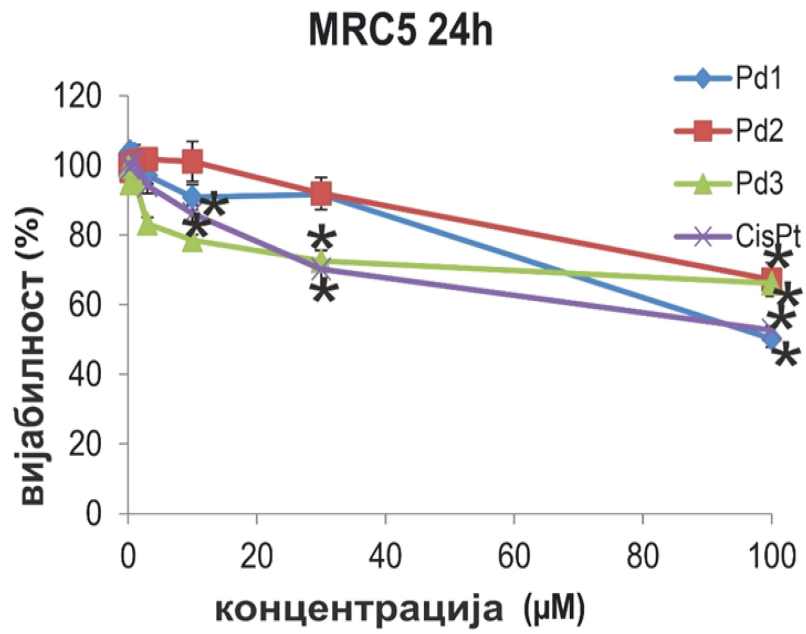
Након што су три комплекса паладијума тестирана на две малигне ћелијске линије PC-3 и DU-145 и показала снажан цитотоксични ефекат, наредни корак у нашој студији је био испитивање саме селективности тестираних једињења. Прецизније, задатак је био утврђивање антипролиферативног ефекта Pd1(C₂₈H₂₄N₂O₄Pd), Pd2(C₃₀H₂₈N₂O₄Pd) и Pd3(C₃₄H₃₀N₄O₂Pd) на малигно неизмењене фибробласте MRC5.

После 24 часа инкубације и применом Pd1 једињења, детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на фибробласте само при концентрацији од 100 μM ($p < 0,05$, графикон 7). Када говоримо о нижим вредностима комплекса паладијума није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на MRC5 ћелије ($p > 0,05$, графикон 7).

Слично као и код Pd1 једињења, при тестирању комплекса обележеног као Pd2 детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат при концентрацији од 100 μM ($p < 0,05$, графикон 7). При нижим вредностима Pd2 једињења није дошло до сигнификантног анти туморског дејства на малигно неизмењене фибробласте ($p > 0,05$, графикон 7).

Након тестирања Pd3 једињења при моларностима од 10 μM до 100 μM детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на фибробласте ($p < 0,05$, графикон 7). Када говоримо о нижим концентрацијама од 10 μM Pd3 једињења није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат фибробласте ($p > 0,05$, графикон 7).

Слично као код Pd3 једињења, након примене цисплатине у вредностима од 10 μM до 100 μM детектован је сигнификантни антипролиферативни ефекат на MRC5 ($p < 0,05$, графикон 7). Вредности испитиваног лека које су ниже од 10 μM нису испољиче значајан антипролиферативни ефекат на фибробласте ($p > 0,05$, графикон 7).



Графикон 7. Цитотоксични ефекат једињења паладијума на малигно неизмњеним фибробластима након 24 сата инкубације

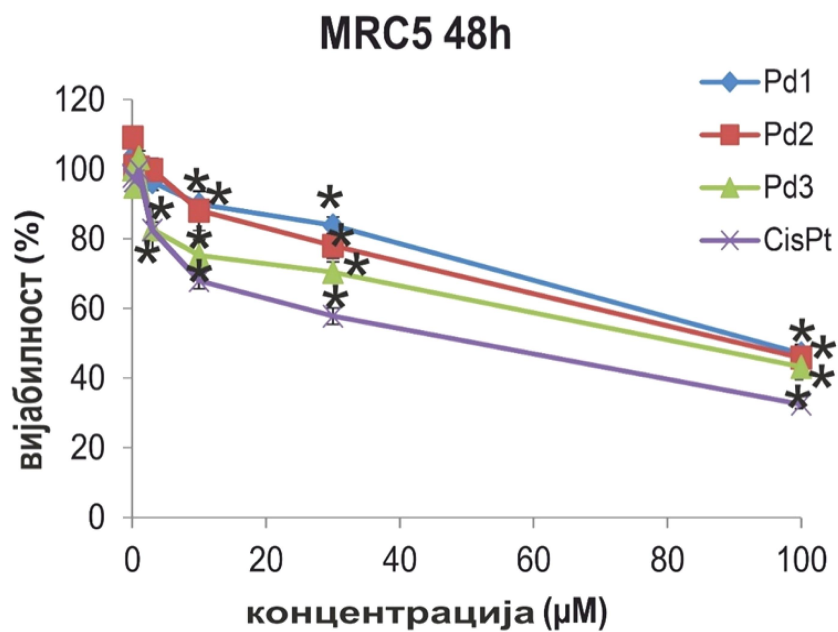
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА *MRC5* ЋЕЛИЈЕ НАКОН 48 ЧАСОВА ИНКУБАЦИЈЕ

Након 48 сати инкубације и третмана *Pd1* једињењем до сигнификантног антипролиферативног дејства на фибробласте је показано при концентрацијама од 30 μM и 100 μM ($p < 0,05$, графикон 8). При нижим вредностима тестираног паладијум комплекса није показан сигнификантни антипролиферативни ефекат на *MRC5* ћелије ($p > 0,05$, графикон 8).

Слично као и код комплекса *Pd1*, након третмана *Pd2* комплексом до сигнификантног антипролиферативног дејства на фибробласте дошло је при концентрацијама од 30 μM и 100 μM ($p < 0,05$, графикон 8). Осим тога, при мањим концентрацијама комплекса није демонстриран сигнификантни антипролиферативни ефекат на *MRC5* ћелије ($p > 0,05$, графикон 8).

Након 48-часовног третмана *MRC5* ћелија једињењем *Pd3* до сигнификантног антипролиферативног дејства на фибробласте је дошло при концентрацијама од 3 μM до 100 μM ($p < 0,05$, графикон 8). При моларним концентрацијама једињења паладијума нижим од 3 μM није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије ($p > 0,05$, графикон 8).

После 48 часова инкубације и третмана *MRC5* ћелија цисплатином до сигнификантног антипролиферативног ефекта је дошло при вредностима од 3 μM до 100 μM ($p < 0,05$, графикон 8). Вредности лека ниже од од 3 μM нису показале снажан антипролиферативни ефекат на фибробласте ($p > 0,05$, графикон 8).



Графикон 8. Цитотоксични ефекат једињења паладијума на малигно неизмњеним фибробластима након 48 часова инкубације

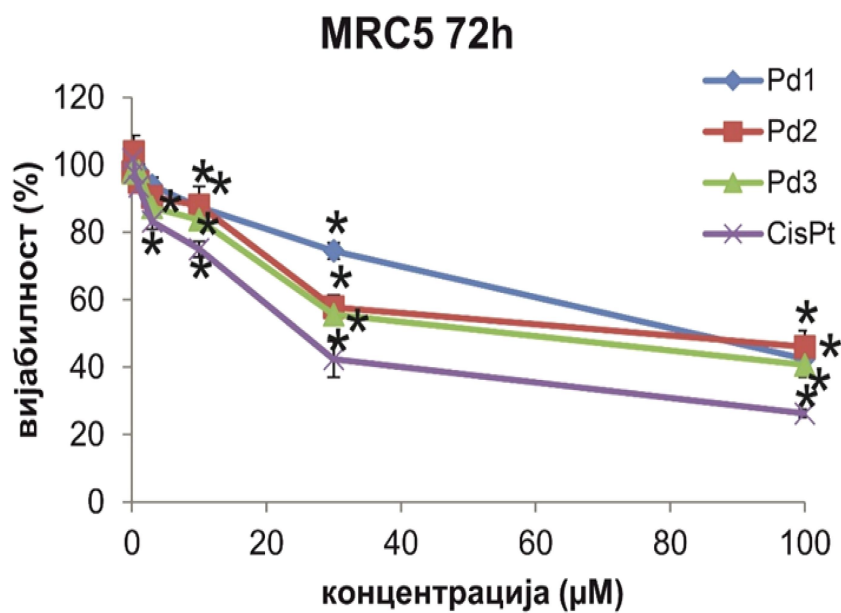
АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ ЈЕДИЊЕЊА ПАЛАДИЈУМА И ЦИСПЛАТИНЕ НА *MRC5* ЋЕЛИЈЕ НАКОН 72 ЧАСА ИНКУБАЦИЈЕ

После третмана *MRC5* ћелија *Pd1* једињењем и 72 часа инкубације до сигнификантно антипролиферативно дејстводетектовано је при вредностима од $10\mu\text{M}$ до $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 9). Уколико говоримо о вредностима комплекса паладијума нижим од $10\mu\text{M}$ треба напоменути да није детектован сигнификантни антипролиферативни ефекат на малигно неизмењене ћелије ($p > 0,05$, графикон 9).

Тестиран антитуморски ефекат *Pd2* једињења на фибробласте демонстрирао је сигнификантни антипролиферативни ефекат при концентрацији комплекса од $10\mu\text{M}$ до $100\mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 9). Насупрот томе, ниже вредности од $10\mu\text{M}$ *Pd2* комплекса нису идуковале сигнификантни антипролиферативни ефекат на *MRC5* ћелије ($p > 0,05$, графикон 9).

Наши резултати су демонстрирали да након третмана фибробласта *Pd3* једињењем у концентрацијама од $3\mu\text{M}$ до $100\mu\text{M}$ индукује се сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 9). Ниже вредности од претходно поменутих нису нису показале снажан антипролиферативни ефекат на *MRC5* ћелије ($p > 0,05$, графикон 9).

Применом цисплатине резултати су демонстрирали да у концентрацијама од $3\mu\text{M}$ до $100\mu\text{M}$ долази до сигнификантног антипролиферативног дејства на *MRC5* ћелије ($p < 0,05$, графикон 9). Као и код *Pd3* једињења, ниже вредности цисплатине од $3\mu\text{M}$ нису идуковале сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$, графикон 9).



Графикон 9. Цитотоксични ефекат једињења паладијума на малигно неизмњеним фибробластима након 72 сата инкубације

MRC5				
<i>IC</i>₅₀ (μM)	Pd1	Pd2	Pd3	cisplatin
72h	83.0 ± 8	49.2 ± 5	42.3 ± 4	24.4 ± 0.8
48h	92.4 ± 9	78.5 ± 7	75.6 ± 7	41.9 ± 4
24h	94.3 ± 9	87.7 ± 8	80.7 ± 8	90.1 ± 9

Табела 3. IC50 вредности

ЈЕДИЊЕЊА ПАЛДИЈУМА ИНДУКУЈУ АПОПТОЗУ

Претходно описани статистички подаци везани за антитуморску активност три комплекса паладијума *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* указују да постоји снажно антипролиферативно дејство на ћелије карцинома простате *PC-3* и *DU-145*. Са друге стране, важно је напоменути да је антипролиферативни ефекат претходно поменутих једињења значајно слабији на фибробласте. Стога, наредни циљ нашег истраживања је дефинисање којим типом ћелијске смрти се индукује снажан антипролиферативни ефекат на канцерске ћелије ова три једињења паладијума. Ћелије које смо користили експериментално су третиране IC_{50} вредностима паладијум једињења након 24 часа култивације. За анализу и добијање валидних резултата о типу ћелијске смрти користили смо *Annexin V/7AAD* методологију.

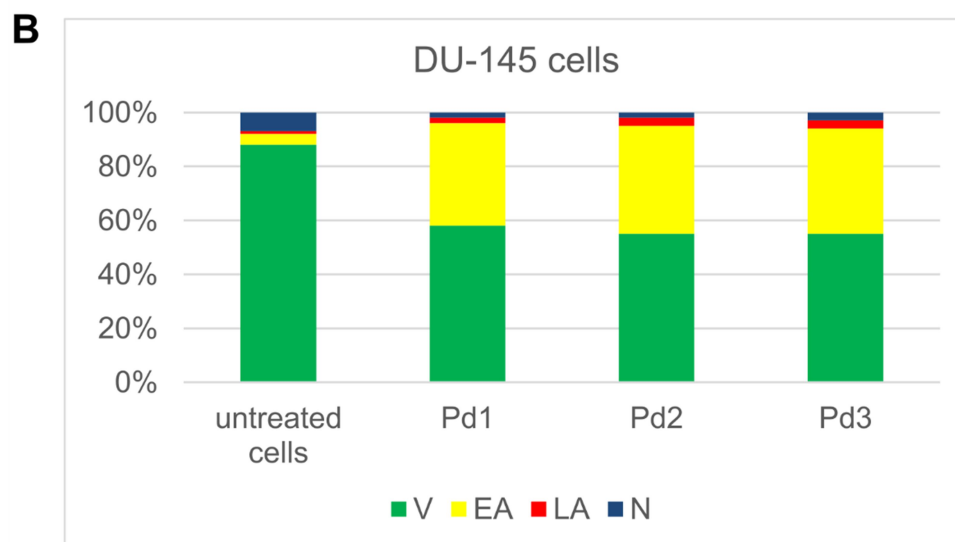
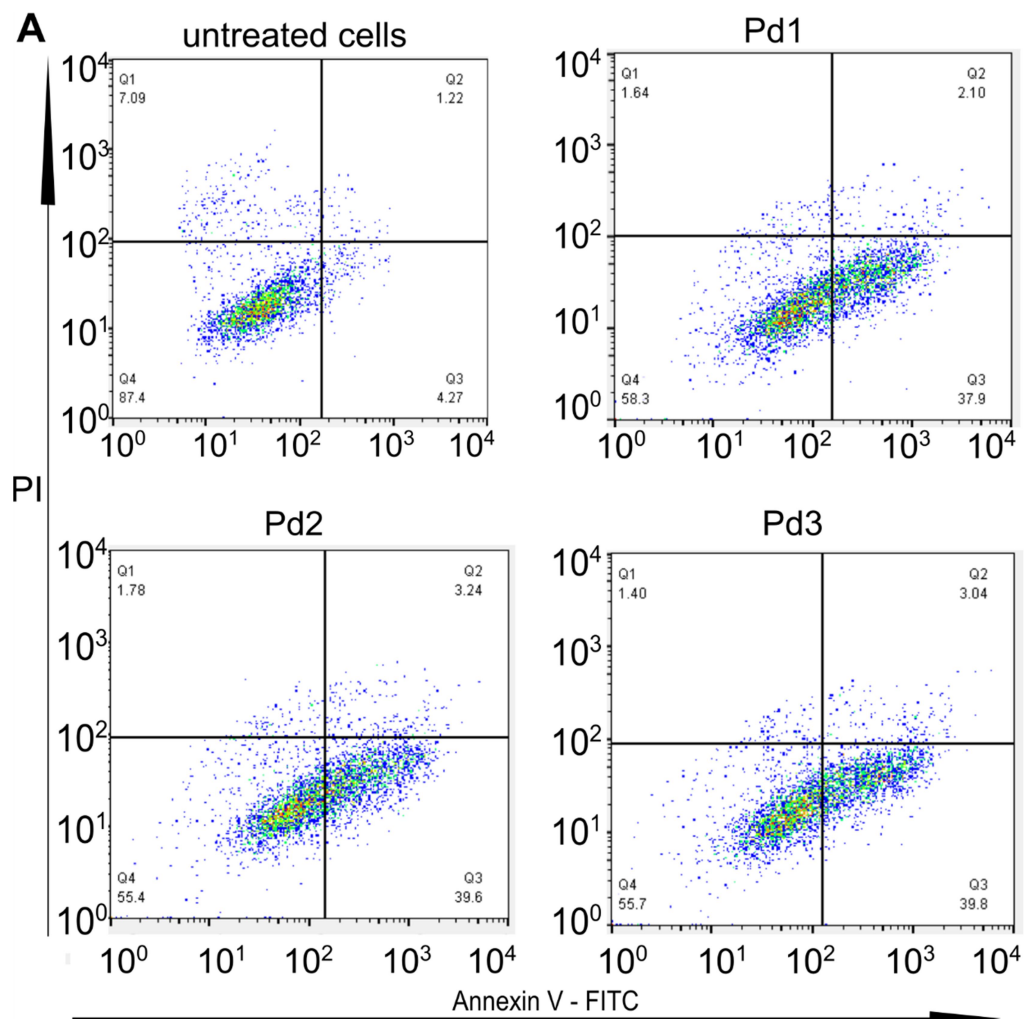
После 24-часовне инкубације без третмана једињењима паладијума на *DU-145* ћелије (што у нашем случају представља контролну популацију ћелија), око 87% детектованих ћелија је било вијабилно. Даље, око 3% испитиваних малигних ћелија се налазило у стадијуму почетне апоптозе, док је око 10% ћелија детектовано у стадијуму некрозе. На основу претходно поменутих чињеница можемо јасно закључити да су нетретиране *DU-145* ћелије у највећем проценту биле вијабилне.

Тестирањем *Pd1* једињења након 24 часа инкубације детектовано је око 58% вијабилних испитиваних малигних ћелија ћелија. Такође, детектовано је око 37% *DU-145* ћелија у стадијуму ране апоптозе, док се око 2,5% ћелија налазило у стадијуму касне апоптозе. Преосталих 2,5% тестираних канцерских ћелија детектовано је у фази некрозе. Стога, можемо закључити да у присуству *Pd1* једињења долази до индукције ране апоптозе *DU-145* ћелија, ако поредимо са контролном нетретираном популацијом ћелија.

Применом *Pd2* једињења, проценат вијабилних *DU-145* ћелија је износио око 55%, док се у стадијуму ране апоптозе налазио око 40% испитиваних ћелија. Даље, око 3% канцерских ћелија је детектовано у стадијуму касне некрозе, док се 2% ћелија налазило у стадијуму некрозе. На основу претходно наведених чињеница, јасно је да у присуству *Pd2* комплекса се активира процес ране апоптозе *DU-145* ћелија, ако поредимо са популацијом ћелија које нисмо третирали комплексима паладијума.

Истраживање је показало да након примене *Pd3* једињења детектовани проценат вијабилних *DU-145* ћелија је износио око 55%. Осим тога, око 39% тестираних канцерских ћелија је детектовано у стадијуму ране апоптозе, док веома мали проценат је детектован у стадијумима касног апоптотског процеса и некрозе. Резултати јасно указују да у присуству *Pd3* једињења активира се процес ране апоптозе *DU-145* ћелија, ако поредимо резултате са контролном нетретираном популацијом (графикон 10).

Сва испитивана једињења *Pd(II)* свој сигнификантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије карцинома простате остварују активацијом ране апоптозе.



Графикон 10. Детекција апоптозе

КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС

У процесу малигне трансформације есенцијалну улогу има инхибиција процеса апоптозе и поремећај регулације ћелијског циклуса. Већина хемиотерапеутика који се клинички примењују свој антиканцерски ефекат остварује активирањем апоптотског пута и индукцијом застоја ћелијског циклуса.

Тестирана паладијум једињења *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* према претходно приказаним резултатима своје антипролиферативно дејство остварују индукцијом апоптозе. У следећем кораку истраживања циљ је био показати да ли претходно наведена једињења свој антиканцерски ефекат остварују искључиво активацијом апоптозе или утичу и на ћелијски циклус. Прецизније, да ли комплекси паладијума активирају оба претходно поменута механизма и тиме демонстрирају снажан антитуморски ефекат.

Контрола у овом случају су канцерске *DU-145* ћелије које нису третиране једињењима паладијума. Након 24 часа инкубационог периода детектовали смо проценат малигно трансформисаних ћелија које су у *G0/G1*, *S* и *G2/M* фази.

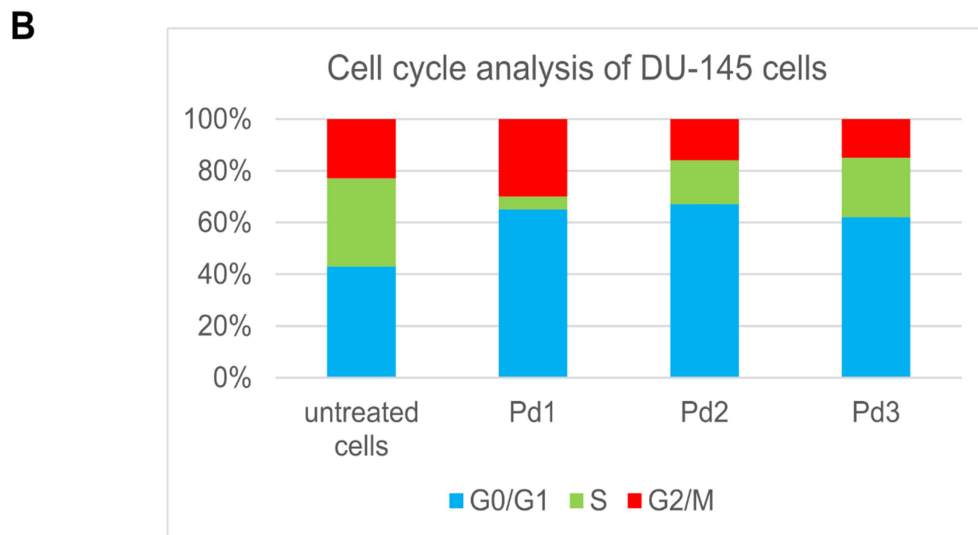
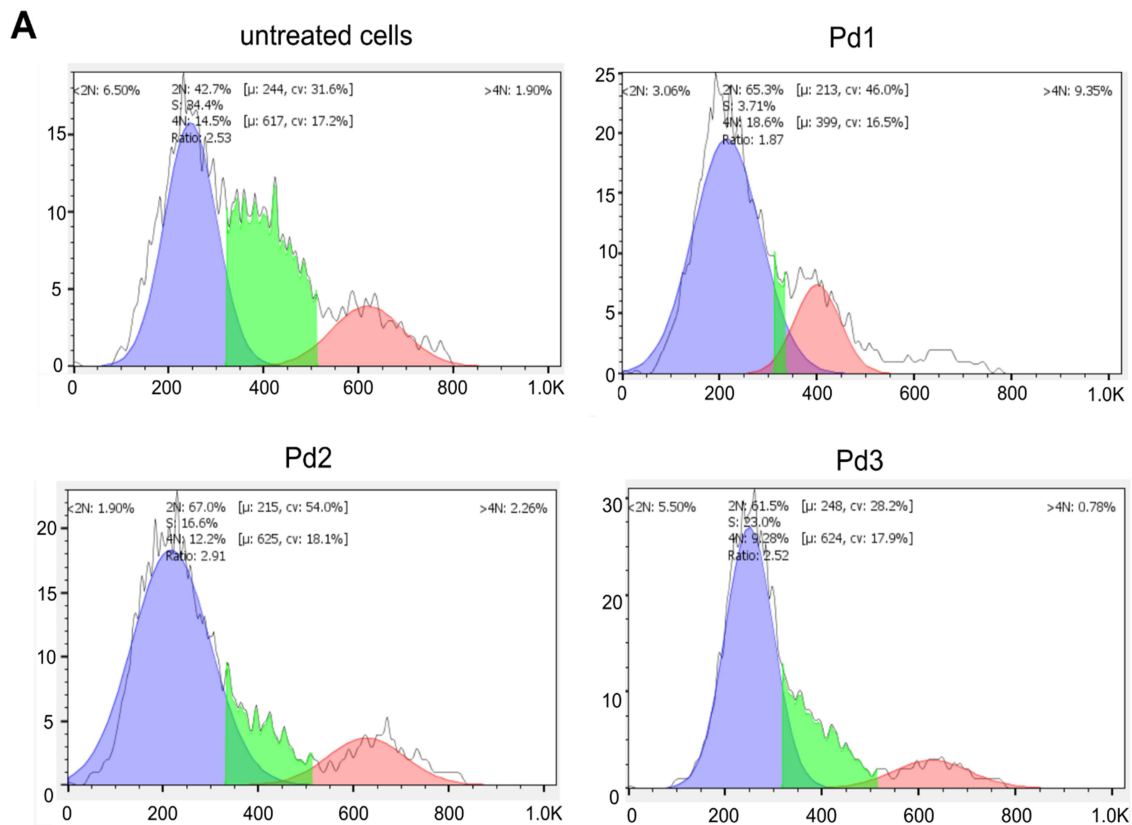
Када говоримо о контролној популацији *DU-145* ћелија, након 24 часа инкубације око 43% ћелија је детектовано у *G0/G1* фази ћелијске деобе, а у *S*-фази ћелијске деобе детектовано је 34,4% канцерских ћелија. Преосталих 22,6% малигнућ ћелија је детектовано у *G2/M* фази ћелијске деобе. На основу претходно поменутих података можемо рећи да се највећи проценат ћелија у контролној популацији налазио у *G0/G1* фази.

Након примене *Pd1* једињења у *in vitro* условима 65,3% малигнућ ћелија је детектовано у *G0/G1* фази ћелијске деобе. У следећој *S*-фази ћелијске деобе се налазило 3,7% ћелија, док је у *G2/M* фази детектовано око 31% малигнућ ћелија. У поређењу са контролном нетретираном популацијом ћелија, можемо рећи да је дошло до статистички сигнификантне измене процената ћелија које су се налазиле у *G0/G1* фази циклуса.

Наше истраживање је демонстрирало да након примене *Pd2* једињења и 24-часовне инкубације у *G0/G1* фази ћелијске деобе је детектовано 67% *DU-145* ћелија, док је у *S*-фази ћелијске деобе детектовано 16,6%. Преосталих око 16% малигнућ ћелија је детектовано у *G2/M* фази ћелијске деобе. Резултати нам јасно показују да статистички значајан пораст процената ћелија у односу на контролну популацију (нетретиране *DU-145* ћелије) је детектован у *G0/G1* фази ћелијског циклуса.

После третмана комплексом *Pd3*, проценат *DU-145* ћелија детектованих у *G0/G1* фази ћелијске деобе је износио 61,5%. У следећој, *S*-фази ћелијске деобе детектовано је 23% малигнућ ћелија, а у *G2/M* фази тај проценат износио око 16%. Као и код претходних резултата и овде постоји статистичка значајност у *G0/G1* фази ћелијске деобе у односу на контролну популацију који чине нетретиране *DU-145* ћелије (графикон 11).

Све претходно наведене чињенице нам јасно указују да осим индукције апоптозе једињења обележена као *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* могу индуковати застој ћелијске деобе у *G0/G1* фази. Прецизније, можемо са сигурношћу рећи да је сигнификантни антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома простате постигнут комбинацијом претходно поменутих два механизма.



Графикон 11. Детекција фаза ћелијског циклуса

АКТИВАЦИЈА АПОПТОЗЕ

Индукција апоптотског пута је могућа на два начина, активацијом рецептора смрти (везивањем комплементарног лиганда) који је локализован на ћелијској мембрани (спољашњи пут) или оштећењем ћелијских структура (митохондријални пут). Оно што је заједничко за оба претходно поменута механизма је активација проапоптотских протеина и каспаза.

Карактеристично за митохондријални каскадни апоптотски пут је промена у концентрацији есенцијалних протеина који активирају процес и антиапоптотских протеина. Прецизније, да би се сам процес одиграо неопходан је пораст концентрације *Bax* протеина који активира програмирану ћелијску смрт као и смањење концентрације *Bcl-2* молекула који инхибира процес апоптозе. Сама повећана концентрација *Bax* молекула условљава повећану пропустљивост митохондријалне мембране, чиме заправо се ослобађа цитохром *c*. Даље ослобађање ослобађања цитохрома *c* (присуство у цитоплазми) ће довести до активације каспаза-3.

Након што су резултати наше студије демонстрирали да једињења *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* свој антипролиферативни ефекат остварују индукцијом ране апоптозе и инхибицијом одвијања ћелијског циклуса, следећи корак је подразумевао проучавање механизма апоптозе. Прецизније да ли тестирана једињења паладијума индукују спољашњи или унутрашњи апоптотски пут.

Како би јасно дефинисали механизам апоптозе обележили смо *DU-145* ћелије одговарајућим примарним и секундарним антителима за молекуле *Bax*, *Bcl-2* и каспазу-3. Затим смо дефинисали концентрацију ових молекула на основу мерења просечног интензитета флуоресценције (енг. *MFI* - *mean fluorescence intensity*). Осим тога, дефинисан је проценат канцерских ћелија које емитују флуоресценцију уз коришћење проточног цитометра.

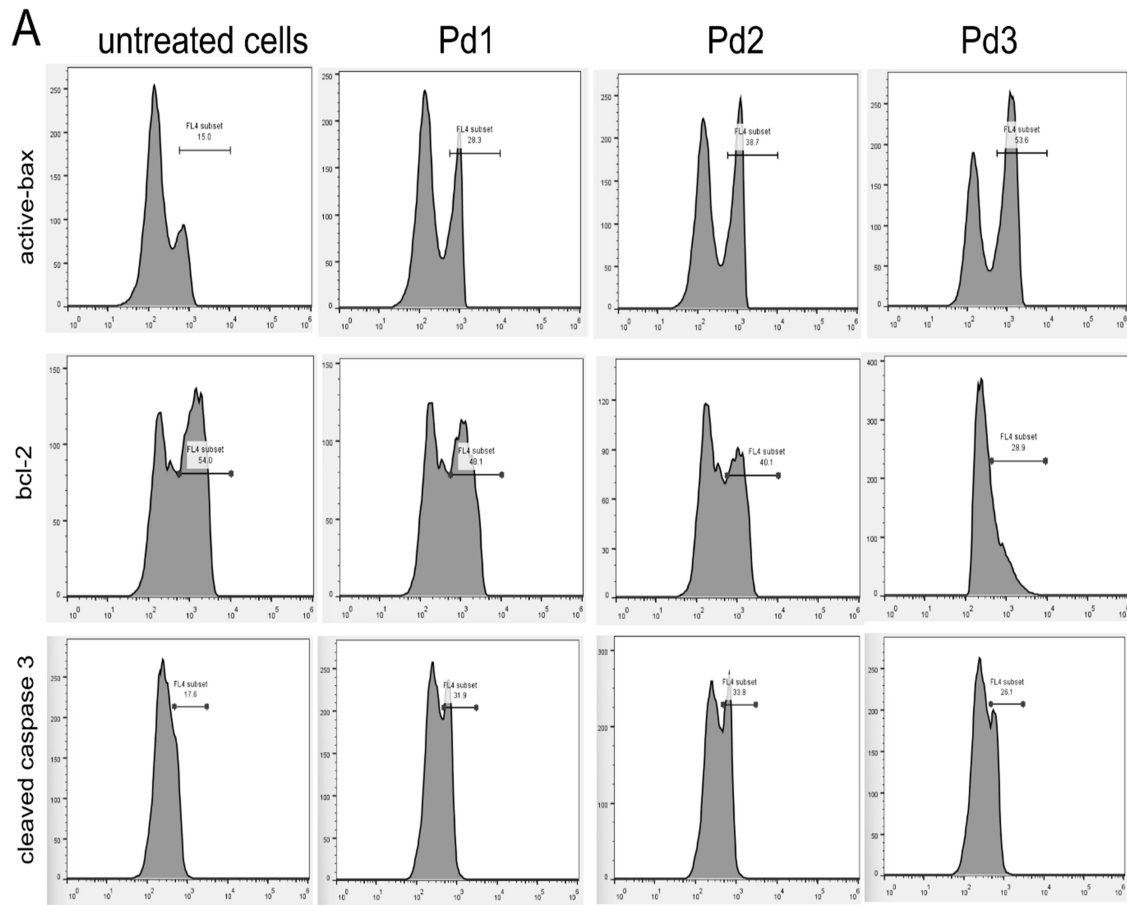
Резултати студије су дефинисали да тестирана једињења *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* снажан антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије остварују индуковањем митохондријалног апоптотског пута. Сва три тестирана паладијум једињења су индуковала сигнификантни пораст просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) *Bax* молекула ако поредимо резултате са контролном популацијом ћелија где нисмо додали испитиване комплексе. Прецизније, ако говоримо о *DU-145* нетретираним ћелијама просечан интензитет флуоресценције за тестирани *Bax* молекул је износио 15. Насупрот томе, када говоримо о третираним *DU-145* ћелијама *MFI* за *Bax* молекула за *Pd1* је износио 29, за *Pd2* 39 и *Pd3* 53.

Након примене *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* једињења дошло је до сигнификантног пада просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) када говоримо о антиапоптотском *Bcl-2* молекулу ако поредимо са контролном популацијом канцерских *DU-145* ћелија. Прецизније, код контролне популација детектовани *MFI* за *Bcl-2* молекул је износио 54. Ако говоримо о третираним *DU-145* ћелијама *MFI* за *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* је измерен редом 48, 40, 29.

Сви демонстрирани резултати указују на чињеницу да је код *DU-145* ћелија које су третиране *Pd(II)* једињењима дошло до промене (смањења) односа *Bcl-2/Bax* молекула чија је вредност за *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* износила 1,65, 1,02 и 0,5.

Пошто је показано да је дошло до промене у концентрацијама регулаторних молекула унутрашњег пута апоптозе, наредни корак у нашем истраживању је подразумевао мерење концентрације каспазе-3.

Након тестирања *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* једињења детектован је сигнификантно повећан број канцерских *DU-145* ћелија које емитују флуоресценцију када поредимо резултате са контролом (ћелије које нису третиране комплексима паладијума). Ово је још један параметар који нам јасно указује на чињеницу да када говоримо о тестираним паладијум једињењима, доминантни антипролиферативни ефекат на *DU-145* ћелије се постиже активацијом митохондријалног апоптотског пута.



B

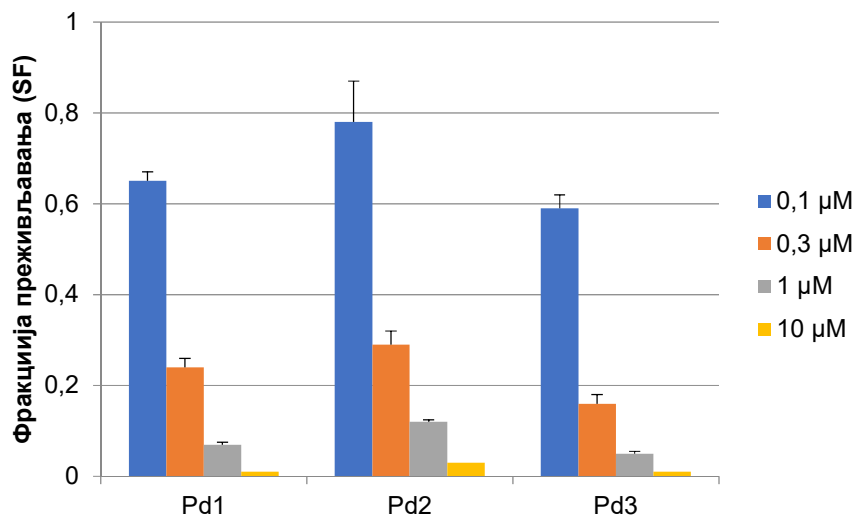
	untreated cells	Pd1	Pd2	Pd3
bax MFI	15	29	39	53
bcl-2 MFI	54	48	40	29
cleaved cas-3 % of cells	18	32	34	26

Графикон 12. Детекција регулаторних протеина апоптозе

ФРАКЦИЈА ПРЕЖИВЉАВАЊА

Након спроведеног тестирања броја ћелија које образују колоније при третману DU-145 ћелија ниским дозама комплекса паладијума, добили смо следеће резултате.

Дугорочни антипролиферативни ефекат *Pd(II)* комплекса је тестиран коришћењем клоногеног теста. Сва тестирана једињења су показала значајан антипролиферативни ефекат, који је био зависан од дозе, а најизраженији ефекат је откривен након третмана са комплексом *Pd3*.



Графикон 13. Фракција преживљавања (Survival fraction, SF) паладијум комплекса на DU-145 ћелије. Резултати су приказани као аритметичка средина ± стандардна девијација.

Показано је да чак и при веома ниским дозама од само 0,1 μM долази до смањења процента ћелија које образују колоније на мање од 60%. То значи да чак и при дозама које немају никакав цитотоксични утицај на DU-145 ћелије, долази до значајног смањења потенцијала да ове ћелије образују колоније, односно да у клиничким околностима дају удаљене метастазе.

5.ДИСКУСИЈА

Канцер је веома озбиљни здравствени проблем, посебо имајући у виду да све већи број млађе популације обољева од различитих типова малигнитета. Када говоримо о настанку малигнитета можемо рећи да у развоју учествује више фактора. Стога, можемо рећи да је канцерогенеза веома сложен и вишестепени процес, који временски може трајати дуго. Есенцијална ствар када говоримо о малигнитетима је неконтролисана пролиферација генски измењених ћелија. Неке канцерске ћелије се веома споро мултипликују, док поједине канцерске ћелије се брже деле у односу на малигно неизмењене ћелије. Стога, можемо извести закључак да тврдња да се канцерске ћелије услед неконтролисане деобе брже деле у односу на малигно неизмењене ћелије није исправна. Брзина пролиферације канцерске ћелије зависи апсолутно од типа малигнитета (3,142, 143).

Да би ћелија малигно пролиферисала кључни кораци су активација прото-онкогена у онкогене, инактивација тумор супресорских гена. Осим тога, развој малигнитета обухвата и генске лезије у антиапоптотском систему. Веома је битно напоменути да су активациони сигнални путеви апоптозе код канцерских ћелија инактивирани чиме је избегнута програмирана ћелијска смрт. Даље, раст и развој тумора је уско повезан са допремањем хранљивих састојака путем процеса који називамо ангиогенеза. Након што малигно измењена ћелија продукује различите факторе раста то ће условити развој нових крвних судова, чији крајњи ефекат је увећање туморске масе. У процесу малигне трансформације канцерске ћелије дедиферентују, губе своју физиолошку улогу, што им омогућава неконтролисан раст и пролиферацију као и лошију прогнозу приликом терапије (3, 142). У физиолошким условима свака ћелија има одређену улогу и „предодређену“ локацију где се налази. Када говоримо о малигно измењеним ћелијама треба поменути њихову могућност лучења ензима који својом каталитичком активношћу оштећују екстрацелуларни матрикс и као последица тога канцерска ћелија продире кроз ткиво. Најчешће се ради о хиперпродукцији металопротеиназа, ензима који омогућавају инвазивност малигно измењених ћелија. Стварање метастаза од стране примарног тумора (ширење канцера на друга ткива) се врши путем лимфних и крвних судова или одвајањем у шупљине тела. Секундарне метастатске промене (настале од примарног тумора) најчешће се детектују у одређеним ткивима, на пример канцер дојке даје метастатске промене најчешће у плућима и мозгу док канцер простате метастазира најчешће у костима (3, 142).

У циљу ефикасне и успешне антиканцерске терапије неопходно је детаљно познавање процеса развоја малигнитета и биохемијских сигналних путева коју учествују у канцерској трансформацији. Можемо рећи да већина хемотерапеутика своју антиканцерску активност испољава оштећењем ДНК молекула и активацијом апоптотског пута (142, 143). Проблем који се јавља приликом примене хемотерапеутика је неселективност односно истовремено цитотоксично дејство на малигно неизмењене ћелије, посебно ћелије које се брзо мултипликују. Дакле из претходно наведене чињенице јасно је да може доћи до оштећења коштане сржи, различитих ткива и органа, успореног зарастања рана, алопеције итд (142).

Можемо закључити да би проналажење иновативних лекова који ће демонстрирати висок степен селективности према туморским ћелијама (мању цитотоксичност према здравим ћелијама) и тиме смањити могућност за настанак резистенције и нежељених ефеката било императив.

Стога велики број научних публикација нам показује да различити комплекси метала имају обећавајућу будућност када је у питању терапија различитих малигнитета. Веома често се може видети у научним публикацијама да је антитуморски ефекат снажнији у односу на цисплатину као и да је степен селективности знатно већи (146, 85). Први корак који се мора дефинисати да бисмо тврдили да је лек потенцијални хемиотерапеутик са снажним антипролиферативним дејством је *in vitro* тестирање уз помоћ *MTT* теста.

Наше истраживање је подразумевало тестирање антипролиферативног ефекта три новосинтетисаних *Pd(II)* једињења које смо обележавали као *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* на ћелије канцера простате *PC-3* и *DU-145*. Осим канцерских ћелија користили смо у експериментима и малигно неизмењене фибробласте *MRC5*. Такође, у циљу детаљнијег антитуморског испитавања користили смо цисплатину као лек који се клинички користи, при чему је то заправо била контрола.

Резултати су показали да *Pd1* комплекс након 24h инкубације показује умерен антипролиферативни ефекат на *DU-145* и *PC-3* ћелије при чему су израчунате IC_{50} вредност износиле $83.6\mu M$ и $94.1\mu M$. Сличан ефекат ово једињење је показало и на фибробласте. Једињење *Pd2* је такође демонстрирало након 24h инкубације умерен антипролиферативни ефекат на свим тестираним ћелијским линијама *DU-145*, *PC-3* и *MRC5* (IC_{50} вредности су износиле редом $75.9\mu M$, $75.2\mu M$ и $87.7\mu M$). Комплекс *Pd3* након 24h инкубационог периода за разлику од претходно два поменути једињења паладијума је демонстрирао снажнији цитотоксични ефекат на малигне ћелије карцинома простате где су IC_{50} вредност су износиле $48.4\mu M$ и $38.4\mu M$. Посебно треба напоменути да једињење *Pd3* је демонстрирало веома слаб антипролиферативни ефекат на фибробласте, IC_{50} вредност је износила $80.7\mu M$. Можемо закључити да је након 24 сата инкубационог периода *Pd3* демонстрирао најснажнији антитуморски ефекат на ћелије канцера простате.

Очекивано, снажнији антитуморски ефекат *Pd1* комплекс је демонстрирао након 48 часа инкубације на *DU-145* и *PC-3* ћелије где су IC_{50} вредност износиле $17.5\mu M$ и $69.8\mu M$. Када говоримо о фибробластима *Pd1* једињење је показао веома слаб антипролиферативни ефекат, IC_{50} вредност је $92.4\mu M$. Једињење *Pd2* након 48 часова инкубације је показало снажан антипролиферативни ефекат на *DU-145* и *PC-3* ћелије, док је веома слаб цитотоксични ефекат демонстриран на фибробласте (IC_{50} вредности су износиле редом $19.2\mu M$, $58.6\mu M$ и $78.5\mu M$). Комплекс *Pd3* је показао снажан антитуморски ефекат на тестиране канцерске ћелије (IC_{50} вредности су износиле $11\mu M$ и $12.5\mu M$) док је снажан антипролиферативни ефекат на фибробласте као и код других тестираних једињења изостао.

Након 72 часа инкубације сва три тестирана једињења паладијума *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* демонстрирала су снажан антипролиферативни ефекат на *DU-145* и *PC-3* ћелије. Када говоримо о фибробластима *Pd1* једињење је испољило веома слаб цитотоксични ефекат при чему је IC_{50} вредност износила $83\mu M$. За разлику од претходно поменутог једињења комплекси обележени као *Pd2* и *Pd3* су демонстрирали умерен цитотоксични ефекат на малигно неизмењене фибробласте при чему су IC_{50} вредности су износиле $49.2\mu M$ и $42.3\mu M$.

Цисплатина је у сва три инкубациона периода, слично као и паладијум комплекси, показала снажан антипролиферативни ефекат на *DU-145* и *PC-3* канцерске ћелије. Ипак треба напоменути да за разлику од три тестирана *Pd(II)* једињења где је снажан цитотоксични ефекат на фибробласте изостао, овај лек је показао снажан антипролиферативни ефекат и на фибробласте, односно показана је јасна неселективност.

Уколико бисмо посматрали израчунате IC_{50} вредности дошли би до закључка да јенајснажнији антипролиферативни ефекат показао *Pd3* комплекс на *DU-145* канцерске ћелије. Такође, јасно је да са повећањем инкубационог периода повећава се и цитотоксичност тестираних једињења као и цисплатине. Иако је снажан антипролиферативни ефекат постигнут на обе тестиране малигне ћелијске линије, ипак посматрајући добијене IC_{50} вредности можемо рећи да су сва три једињења израженије антиканцерско дејство показано на *DU-145* ћелије.

Постоји велики број научних публикација која доказују да је паладијум есенцијална структурна компонента у сваком *Pd(II)* једињењу (у чију структуру улазе одговарајући лиганди) када говоримо о *in vitro* истраживањима.

Истраживање *Simić* и сарадника је тестирало антипролиферативни ефекат пет *Pd(II)* једињења обележена *C1-C5* на канцерске ћелије *DU-145* и *PC-3*. Осим тога, као и у нашој студији, фибробласти су представљали контролну ћелијску линију. Истраживање је јасно показало да са порастом инкубационог периода свих пет паладијум једињења демонстрирају снажан антитуморски ефекат на обе тестиране ћелијске линије карцинома простате. Најбољи ефекат је показао комплекс обележен као *C1* на *PC-3* ћелије. Можемо рећи да је цитотоксични потенцијал *C1-C5* на канцерске ћелије простате сличан нашим *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* једињењима. Међутим, треба напоменути да је студија *Simić* и сарадника такође тестирала антипролиферативну активност одговарајућих лиганада који су обележени као *L1-L5*, при чему је јасно показано да лиганди индукују веома слаб антипролиферативни ефекат на *DU-145* и *PC-3* ћелије. Ово јасно показује значај паладијума у самој структури *C1-C5* комплекса, без присуства паладијума не испољава се цитотоксични ефекат. За разлику од претходно поменутог истраживања, у нашој студији нису испитивани одговарајући лиганди који су чинили структурну компоненту наших једињења. Треба истаћи да комплекси *C1-C5* нису смањили у великој мери стопу пролиферације фибробласта, тако да су забележене високе IC_{50} вредности око $200\mu M$. Ако упоредимо резултате са нашим истраживањем, долазимо до јасног закључка да наша три једињења паладијума су показала мањи степен селективности у односу на комплексе који су тестирани од стране *Simić* и сарадника (87).

Студија спроведена од стране *Hussain* и сарадника је такође показала да серија *Pd(II)* једињења испољава јак антитуморски ефекат на ћелије карцинома дојке *MDA-MB-231* и *MCF-7*, при чему је антиканцерски ефекат једињења обележеног као [*Pd(L1)(CH3CN)*] био најснажнији. Иако истраживање није спроведено на ћелијске линије карцинома простате, као што је то случај у нашој студији, ипак можемо свакако рећи да есенцијална компонента за антитуморску активност је присуство паладијума (154).

Истраживање спроведено од стране *Mbugua* и сарадника је обухватило тестирање антитуморске активности три паладијум једињења обележена као *C1, C2, C3* на великом броју канцерских ћелијских линија *Saco-2* (колоректални карцином), *HeLa* (карцином грлића материце), *HepG2* (карцином јетре), *MCF-7* (карцином дојке), и *PC-3*

(карцином простате). Такође, испитивана је антитуморска активност одговарајућих лиганада који су обележени као *L1-L3*. Једињења обележена као *C1* и *C3* су показала снажан антипролиферативни ефекат на *PC-3* ћелије карцинома простате, слично као и наша тестирана једињења. Такође, једињење *C3* је демонстрирало веома јак антитуморски ефекат на преостале туморске ћелијске линије *Saco-2*, *HeLa*, *HepG2* и *MCF-7*. Битно је напоменути да је снажан антитуморски ефекат када говоримо о лигандима *L1-L3* изостао на свим претходно поменутих малигним ћелијским линијама. Наше истраживање није обухватило тестирање одговарајућих лиганада. Јасно је да је за потенцијални цитотоксични ефекат *C1,C2,C3* од есенцијалног значаја присуство паладијума (155).

Студија *Jakovljevic* и сарадника је обухватила тестирање антитуморског дејства три палдијум комплекса обележена као *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* на ћелије карцинома дојке *MCF-7* and *MDA-MB-231*. Комплекси *Pd1* и *Pd2* су показали умерени антитуморски ефекат на ћелије карцинома дојке, док је *Pd3* комплекс показао веома снажан цитотоксични ефекат на *MCF-7* and *MDA-MB-231*. Комплекс *Pd3* је демонстрирао снажнији антипролиферативни ефекат на *MCF-7* and *MDA-MB-231* у односу на цисплатину. Такође *Pd1* и *Pd2* комплекси су показали веома слаб цитотоксични ефекат на фибробласте док је *Pd3* демонстрирао умерен антипролиферативни ефекат на *MRC5*. Можемо закључити да је *Pd3* комплекс који је тестиран од стране *Jakovljevic* и сарадника имао сличан ефекат на фибробласте као и наша палдијум једињења(156) .

Публикација рада о стране *Omondi* и сарадника нам јасно указује да четири тестирана палдијум једињења обележена као PdL_1 , PdL_2 , PdL_3 и PdL_4 демонстрирају веома снажан антипролиферативни ефекат на канцерске *HeLa* ћелије. Једињења PdL_1 , PdL_2 , PdL_3 за разлику од наших комплекса, показују низак степен селективности. Прецизније демонстрирају снажан антипролиферативни ефекат на контролну ћелијску популацију фибробласте *MRC-5*. Једињење PdL_4 , слично нашим комплексима, је показало веома слаб антипролиферативни ефекат на фибробласте(157).

Као што је напоменуто у одељку у коме је описана детаљно апоптоза, јасно је да „избегавање“ апоптозе је један од механизма који омогућава активну пролиферацију малигно измењених ћелија. Прецизније, основу апоптозе чини један сложени биохемијски механизам чија улога у физиолошким условима је од есенцијалног значаја за сваку ћелију. Такође, треба поменути да индукција програмиране ћелијске смрти укључује два сигнала пута, спољашњи и унутрашњи. Да ли ће се процес програмиране ћелијске смрти активирати у ћелији искључиво зависи од регулаторних молекула као и њихових концентрација унутар ћелије. Ако говоримо о унутрашњем механизму апоптотског пута, постоје регулаторни протеини *Bcl-2* фамилије чија је есенцијална улога у контроли пропустљивости митохондријалне мембране. Прецизније, постоји јасна подела *Bcl-2* молекула на основу улоге, антиапоптотични молекули (*Bcl-2*) и проапоптотични протеини (*Bax*). Да ли ће се процес програмиране ћелијске смрти индуковати, или пак инхибирати, зависиће од односа концентрације *Bax/Bcl-2* (12).

Резултати нашег рада јасно указују да применом палдијум једињења обележеног као *Pd1* долази до индукције апоптотског пута, односно највећи проценат ћелија канцера простате је детектован у раној апоптози. Веома мали проценат је детектован у некрози. Тестирано једињење *Pd2* свој антипролиферативни ефекат испољава активацијом ране апоптозе, односно канцерске ћелије простате су детектоване у највећем проценту у претходно поменутој фази. Као и претходна два тестирана једињења, *Pd3* комплекс је индуковао рану апоптозу *DU-145* ћелија.

Можемо закључити да је цитотоксично дејство сва три комплекса засновано на индукцији апоптозе *DU-145* ћелија.

Студија *Simić* и сарадника је тестирала механизам антитуморског дејства паладијум комплекса који су обележени као *C1-C5* на канцерске ћелије *DU-145* и *PC-3*. Сва претходно поменута једињења су свој снажан антитуморски ефекат на *DU-145* и *PC-3* ћелијске линије испољила активирањем ране апоптозе. Резлтати ове студије су слични као и резултати нашег истраживања (87).

Студија *Jakovljevic* и сарадника је проучавала механизам антипролиферативног ефекта три комплекса паладијума (*Pd1*, *Pd2* и *Pd3*) на ћелије канцера дојке *MCF-7* и *MDA-MB-231*. Једињења *Pd1* и *Pd2* свој антитуморски ефекат на *MCF-7* ћелијесу остварила активацијом касне апоптозе, док је *Pd3* једињење индуковало рану апоптозу. Насупрот томе, једињења *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* свој антипролиферативни ефекат на *MDA-MB-231* ћелијској линији су остварила искључиво активацијом ране апоптозе. Иако претходно поменута студија није рађена на ћелијама канцера простате, као што је то урађено у нашем истраживању, ипак можемо закључити да су резултати слични као и у нашој студији. Прецизније, основу снажног антипролиферативног ефекта чини индукција апоптозе (156).

Истраживање спроведено од стране *Valentini* и сарадника је демонстрирало резултате који су слични нашем истраживању. Прецизније, тестирано паладијум једињење је индуковало процес апоптозе на *LnCaP*, *PC3*, *DUI45* ћелијске линије канцера простате (158).

Публикација *Ulukayari* сарадника је демонстрирала да паладијум једињење индукује умањење стопе вијабилности ћелијских линија канцера простате индукцијом програмиране смрти, чиме је ово истраживање у сагласности са истраживањем у нашој студији (159).

Да би се процес канцерогенезе активно развијао неопходно је да дође до поремећаја у молекуларном механизму ћелијске деобе. У физиолошким условима овај процес служи да се једна ћелија подели на две нове, при чему мора доћи до удвостручавања саставних делова саме ћелије која се дели. Како не би дошло до поремећаја ћелијске деобе и неконтролисаних подела, ћелијски циклус је строго регулисан "checkpoints" тачкама. Ове тачке су кључни механизам где је могуће „поправити“ грешке у току деобе. Дакле, осим „избегавања“ апоптозе за малигну трансформацију је неопходно и пореметити молекуларни механизам ћелијског циклуса (142).

Наша студија је проучавала утицај тестираних паладијум једињења на одвијање ћелијског циклуса, када говоримо о канцерским ћелијама простате *DU-145*. Након третмана *Pd1*, *Pd2* и *Pd3* јасно је показано да долази до застоја у *G0/G1* фази туморских ћелија. Стога, механизам антипролиферативног ефекта наших паладијум једињења се заснива на индукцији апоптозе и застоју ћелијског циклуса.

Истраживање *Simić* и сарадника је проучавало утицај комплекса паладијума *C1-C5* на ћелијски циклус *DU-145* и *PC-3* канцерских ћелија. Резултати овог истраживања су јасно демонстрирали да једињење обележено као *C1* не доводи до заустављања ћелијског циклуса *PC-3* ћелија, већ је активација апоптозе кључни механизам када говоримо о цитотоксичности ових једињења. Даље, једињења *C2-C5* прекидају ћелијску деобу у *G2/M* фази *PC-3* ћелија. Када говорио о следећој ћелијској линији *DU-145*, једињења *C1*, *C3*, *C4* и *C5* прекидају ћелијску деобу у *G0/G1* фази. Ови резултати

су у сагласности са резултатима добијеним у нашој студији. Преостало једињење обележено као *C2* је инхибирало ћелијску деобу *DU-145* ћелија у *S* фази (87).

Истраживачки тим који чине *Hassonai* сарадници је у својој публикацији показао да тестирани паладијум комплекс осим индукције апоптозе доводи и до застоја ћелијског циклуса у *G0/G1* фази канцерских ћелија. Резултати добијени у овој студији су слични као и резултати дефинисани у нашем истраживању (160).

Студија спроведена од стране *Li* и сарадника је демонстрирала да паладијум једињења свој антипролиферативни потенцијал испољавају инхибицијом ћелијске деобе у *S* фази. За разлику од резултата које је показала претходно поменута студија, наши резултати доказују застој у *G0/G1* фази (161).

Када говоримо о антитуморској активности *Pd(II)* комплекса која је повезана са ћелијским циклусом, на основу свега претходно наведеног долазимо до закључка да различита једињења паладијума могу инхибирати ћелијски циклус у различитим фазама.

У нашем истраживању показано је да приликом примене комплекса обележених као *Pd1*, *Pd2*, *Pd3* долази до повећања експресије проапоптотског молекула *Bax* код *DU-145* тестираних канцерских ћелија. Овакав пораст проапоптотског молекула *Bax* праћен је статистички значајним смањењем концентрације антиапоптотичног протеина *Bcl-2*. Можемо закључити да тестирани супстанце смањују однос *Bcl-2/Bax* и активирају митохондријални пут апоптозе. Осим тога, код тестираних ћелијских линија детектован је и повећан проценат ћелија где се налази активна форма егзекуторске каспазе 3.

Студија *Simić* и сарадника је показала да комплекси паладијума *C1-C5* индукују процес апоптозе код *DU-145* и *PC-3* канцерских ћелија. Прецизније свој антипролиферативни ефекат ова једињења остварују смањењем односа *Bcl-2/Bax* и активацијом каспазе 3 (87). Добијени резултати у овој студији у сагласности са резултатима добијеним у нашој студији.

Истраживање *Jakovljević* и сарадника је показало да тестирани комплекси паладијума индукују апоптозу код канцерских ћелија *MCF-7* и *MDA-MB-231*. Прецизније свој антипролиферативни ефекат остварују индукцијом унутрашњег митохондријалног пута смањењем односа *Bcl-2/Bax* и активацијом каспазе 3. Добијени резултати у овом истраживању су у сагласности са резултатима добијеним у нашем истраживању (156).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведене студије можемо закључити да три новосинтетисана једињења палладијума која смо обележили као $Pd1(C_{28}H_{24}N_2O_4Pd)$, $Pd2(C_{30}H_{28}N_2O_4Pd)$ и $Pd3(C_{34}H_{30}N_4O_2Pd)$ демонстрирају веома снажан антивијабилни ефекат на ћелије карцинома прпостате $DU-145$ и $PC-3$ у *in vitro* условима. Снажан антивијабилни ефекат ових једињења је омогућен индукцијом ране апоптозе. У тестираним малигним ћелијама једињења палладијума свој антитуморски ефекат остварују и услед индукције застоја ћелијског циклуса. Детаљнијом анализом програмиране ћелијске смрти је доказано да након третмана палладијум једињењима долази до повећања релативног односа $Bax/Bcl-2$, што условљава активацију каспазе-3 и индукцију апоптозе.

РЕФЕРЕНЦЕ

1. Idris Koya A, Ibrahim SA. Carcinogenesis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
2. Loscalzo J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 21st ed. New York (NY): McGraw-Hill Education; 2022.
3. Čvorišćec D, Čepelak I, ur. *Štrausova medicinska biokemija*. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
4. Baba AI, Cătoi C. *Comparative Oncology*. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
5. National Cancer Institute. The Genetics of Cancer [Internet]. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>
6. Motofei, I. G. (2018). Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Investigation*, 36(5), 309–17. <https://doi.org/10.1080/07357907.2018.1477955>
7. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Oncogenes.
8. Nyga A, Ganguli S, Matthews HK, Baum B. The role of RAS oncogenes in controlling epithelial mechanics. *Trends Cell Biol.* 2023 ;33(1):60-9.
9. Saeed O, Lopez-Beltran A, Fisher KW, Scarpelli M, Montironi R, Cimadamore A, Massari F, Santoni M, Cheng L. RAS genes in colorectal carcinoma: pathogenesis, testing guidelines and treatment implications. *J Clin Pathol.* 2019 ;72(2):135-39.
10. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert AP, Noel S, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005 17;92(1):131-9.
11. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes.* 2017;8(4):116.
12. 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. doi:10.3389/fonc.2022.985363.
13. Ramesh P, Medema JP. BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. *Apoptosis.* 2020;25(5-6):305-320.
14. Klanova M, Klener P. BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):938.
15. Westbrook CA. The ABL oncogene in human leukemias. *Blood Rev.* 1988 ;2(1):1-8.
16. Joyce C, Rayi A, Kasi A. Tumor-Suppressor Genes. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
17. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Tumor Suppressor Genes.
18. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature.* 1986;319:783–84.

19. Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(4):267-76.
20. Marvalim C, Datta A, Lee SC. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy. *Theranostics.* 2023;13(4):1421-2.
21. Mattioni M, Soddu S, Prodosmo A, Visca P, Conti S, Alessandrini G, Facciolo F, Strigari L. Prognostic role of serum p53 antibodies in lung cancer. *BMC Cancer.* 2015;15:148.
22. Bergqvist M, Brattström D, Larsson A, Hesselius P, Brodin O, Wagenius G. The role of circulating anti-p53 antibodies in patients with advanced non-small cell lung cancer and their correlation to clinical parameters and survival. *BMC Cancer.* 2004;4:66.
23. Stoppa-Lyonnet D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here? *Eur J Hum Genet.* 2016;24 Suppl 1(Suppl 1):S3-9.
24. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer.* 2019;10(9):2109-27.
25. Schiliro C, Firestein BL. Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. *Cells.* 2021;10(5):1056.
26. Baba AI, Cătoi C. Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
27. Chen Huang, Zichuan Xie, Jiajin Li, Chenliang Zhang. Mitochondria and tumorigenesis: Molecular basis and therapeutic implications. *Genes & Diseases;*2025. doi.org/10.1016/j.gendis.2025.101806.
28. Zong Y, Li H, Liao P, Chen L, Pan Y, Zheng Y, et al. Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9:124. doi:10.1038/s41392-024-01839-8.
29. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett.* 2019;17(5):4213-21.
30. Marco Cordani, Federica Michetti, Ali Zarrabi, Atefeh Zarepour, Cristiano Rumio, Raffaele Strippoli, Fabrizio Marcucci. The role of glycolysis in tumorigenesis: From biological aspects to therapeutic opportunities. *Neoplasia.* doi.org/10.1016/j.neo.2024.101076.
31. Rivel T, Ramseyer C, Yesylevskyy S. The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin. *Sci Rep.* 2019;9(1):5627.
32. Kankanala VL, Zubair M, Mukkamalla SKR. Carcinoembryonic Antigen. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
33. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: *Madame Curie Bioscience Database.* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
34. Malik G, Knowles LM, Dhir R, Xu S, Yang S, Ruoslahti E, Pilch J. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Res.* 2010;70(11):4327-34.
35. Giona S. The Epidemiology of Prostate Cancer. In: Bott SRJ, Ng KL, editors. *Prostate Cancer.* Brisbane (AU): Exon Publications; 2021.

36. 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: a cancer journal for clinicians*. 2021.
37. Teoh JYC, Hirai HW, Ho JMW, Chan FCH, Tsoi KKF, Ng CF. Global incidence of prostate cancer in developing and developed countries with changing age structures. *PLoS One*. 2019;14(10):e0221775.
38. European Association of Urology. *Epidemiology and Aetiology*. In: *EAU Guidelines on Prostate Cancer*. European Association of Urology; 2025. <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer/chapter/epidemiology-and-aetiology>
39. Pron G. Prostate-Specific Antigen (PSA)-Based Population Screening for Prostate Cancer: An Evidence-Based Analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2015;15(10):1-64.
40. Србија
41. Singh O, Bolla SR. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Prostate*. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
42. Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(3):565-75, viii-ix.
43. Bergengren O, Pekala KR, Matsoukas K, Fainberg J, Mungovan SF, Bratt O, Bray F, Brawley O, Luckenbaugh AN, Mucci L, Morgan TM, Carlsson SV. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. *Eur Urol*. 2023;84(2):191-206.
44. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63-89.
45. Oczkowski M, Dziendzikowska K, Pasternak-Winiarska A, Włodarek D, Gromadzka-Ostrowska J. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. *Nutrients*. 2021;13(2):496.
46. Morton RA Jr, Witte MN. Prostate Cancer and African-American Men. *Oncology*. 1997;11(5).
47. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, De Marzo AM. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol*. 2003;163(3):923-33.
48. Merriel SW, Akter N, Zakkak N, Swann R, McPhail S, Rubin G, Lyrtzopoulos G, Abel G. Factors affecting prostate cancer detection through asymptomatic prostate-specific antigen testing in primary care in England: evidence from the 2018 National Cancer Diagnosis Audit. *Br J Gen Pract*. 2025;75(754):e300-e305.
49. Ojewola RW, Jeje EA, Tijani KH, Ogunjimi MA, Anunobi CC. Clinico-pathological Correlation of Digital Rectal Examination Findings Amongst Nigerian Men with Prostatic Diseases: A Prospective Study of 236 Cases. *Niger J Surg*. 2013 ;19(1):26-31.
50. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):383-91.
51. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, et al., editors. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. ISBN: 978-953-176-759-0

52. Lumbreras B, Parker LA, Caballero-Romeu JP, Gómez-Pérez L, Puig-García M, López-Garrigós M, García N, Hernández-Aguado I. Variables Associated with False-Positive PSA Results: A Cohort Study with Real-World Data. *Cancers (Basel)*. 2022;15(1):261.
53. Gravestock P, Shaw M, Veeratterapillay R, et al. Prostate Cancer Diagnosis: Biopsy Approaches. In: Barber N, Ali A, editors. *Urologic Cancers*. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022.
54. Najjar S, Mirvald C, Danilov A, Labanaris A, Vlaicu AG, Giurca L, Sinescu I, Surcel C. Comparative Analysis of Diagnostic Accuracy and Complication Rate of Transperineal Versus Transrectal Prostate Biopsy in Prostate Cancer Diagnosis. *Cancers*. 2025;17(6):1006.
55. Dijkstra CD. Nobelprijs Fysiologie of Geneeskunde 2002 voor onderzoek naar de genetische regulatie van orgaanontwikkeling en geprogrammeerde celdood [Nobel Prize for Physiology or Medicine 2002 is awarded for research into the genetic regulation of organ development and programmed cell death]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2002 ;146(52):2525-7.
56. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, Abbas K, Moinuddin, Hassan MI, Habib S, Islam S. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*. 2024;13(22).
57. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30(1):87.
58. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*. 2022;27(8):482–508.
59. Han YH, Wang Y, Lee SJ, Jin MH, Sun HN, Kwon T. Regulation of anoikis by extrinsic death receptor pathways. *Cell Commun Signal*. 2023;21(1):227.
60. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res*. 2007;17(9):759–771.
61. Diaz Arguello OA, Haisma HJ. Apoptosis-Inducing TNF Superfamily Ligands for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1543.
62. Siegmund D, Mauri D, Peters N, Juo P, Thome M, Reichwein M, Blenis J, Scheurich P, Tschopp J, Wajant H. Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mediate up-regulation of c-Fos by Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) via a FLICE inhibitory protein (FLIP)-regulated pathway. *J Biol Chem*. 2001 Aug 31;276(35):32585-90.
63. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J*. 2009 ;23(6):1625-37.
64. Dho SH, Cho M, Woo W, Jeong S, Kim LK, et al. Caspases as master regulators of programmed cell death: apoptosis, pyroptosis and beyond. *Exp Mol Med*. 2025;57:1121–32.
65. „Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6“. *ScienceDirect Topics*. Elsevier; <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/tumor-necrosis-factor-receptor-superfamily-member-6>
66. Mollinedo F, Gajate C. FasL-Independent Activation of Fas. In: *Madame Curie Bioscience Database*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.

67. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(7):1215-28.
68. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(2):87-103.
69. Morgan MJ, Liu ZG. Reactive oxygen species in TNF α -induced signaling and cell death. *Mol Cells*. 2010 Jul;30(1):1-12.
70. Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, Ronin E, Piaggio E, Cohen JL. Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front Immunol*. 2018;9:444.
71. Ge Z, Sanders AJ, Ye L, Jiang WG. Aberrant expression and function of death receptor-3 and death decoy receptor-3 in human cancer. *Exp Ther Med*. 2011;2(2):167-72.
72. Death receptor 3. In: ScienceDirect Topics.Elsevier; <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/death-receptor-3>
73. Ge Z, Sanders AJ, Ye L, Mansel RE, Jiang WG. Expression of death receptor-3 in human breast cancer and its functional effects on breast cancer cells in vitro. *Oncol Rep*. 2013;29(4):1356-64.
74. Vogler M, Braun Y, Smith VM, Westhoff MA, Pereira RS, Pieper NM, Anders M, Callens M, Vervliet T, Abbas M, Macip S, Schmid R, Bultynck G, Dyer MJ. The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2025;10(1):91.
75. Westaby D, Jimenez-Vacas JM, Padilha A, Varkaris A, Balk SP, de Bono JS, Sharp A. Targeting the Intrinsic Apoptosis Pathway: A Window of Opportunity for Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;14(1):51.
76. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11549-56.
77. Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(25):3127-35.
78. Croce CM, Vaux D, Strasser A, Opferman JT, Czabotar PE, Fesik SW, et al. The BCL-2 protein family: from discovery to drug development. *Cell Death Differ*. 2025;32:1369–81.
79. D'Aguzzo S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells*. 2020;9(5):1287.
80. Hogg-Binder SA, Klein D, Wolfsperger F, Huber SM, Hennenlotter J, Stenzl A, Rudner J. Protein Levels of Anti-Apoptotic Mcl-1 and the Deubiquitinase USP9x Are Cooperatively Upregulated during Prostate Cancer Progression and Limit Response of Prostate Cancer Cells to Radiotherapy. *Cancers (Basel)*. 2023;15(9):2496.
81. Elsayed SA, Harrypersad S, Sahyon HA, El-Magd MA, Walsby CJ. Ruthenium(II)/(III) DMSO-Based Complexes of 2-Aminophenyl Benzimidazole with In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. *Molecules*. 2020;25(18):4284.
82. Abdolmaleki S, Ghadermazi M, Aliabadi A. Novel Tl(III) complexes containing pyridine-2,6-dicarboxylate derivatives with selective anticancer activity through inducing mitochondria-mediated apoptosis in A375 cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):15699

83. Bazsefidpar P, Eftekhari E, Jahromi MZ, Nikpoor AR, Moghadam ME, Zolghadri S. In-vitro cytotoxicity and in-vivo antitumor activity of two platinum complexes with 1,3-dimethyl pentyl glycine ligand against breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2023;241:112144.
84. Cosentino K, García-Sáez AJ. Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol.* 2017;27(4):266-275.
85. Čanović P, Simović AR, Radisavljević S, Bratsos I, Demetri N, Mitrović M, Zelen I, Bugarčić ŽD. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem.* 2017;22(7):1007-28.
86. Zarić MM, Čanović PP, Stanojević Pirković M, Knežević SM, Živković Zarić RS, Popovska Jovičić B, et al. New gold pincer-type complexes induce caspase-dependent apoptosis in human cancer cells in vitro. *Vojnosanit Pregl.* 2021;78(8):865–73.
87. Simić D, Zarić M, Nikolić I, Živković-Zarić R, Čanović P, Kočović A, Radojević I, Raković I, Jovičić Milić S, Petrović Đ, Stojković D, Vuković N, Kačániová M, Vukić M, Jevtić V. Newly synthesized palladium(II) complexes with aminothiazole derivatives: in vitro study of antimicrobial activity and antitumor activity on the human prostate cancer cell line. *Dalton Trans.* 2022;51(3):1191-1205.
88. Alshehri B. Cytochrome c and cancer cell metabolism: A new perspective. *Saudi Pharm J.* 2024;32(12):102194.
89. Wan J, Kalpage HA, Vaishnav A, Liu J, Lee I, Mahapatra G, Turner AA, Zurek MP, Ji Q, Moraes CT, Recanati MA, Grossman LI, Salomon AR, Edwards BFP, Hüttemann M. Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation. *Sci Rep.* 2019;9(1):15815.
90. Eleftheriadis T, Pissas G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Cytochrome c as a Potentially Clinical Useful Marker of Mitochondrial and Cellular Damage. *Front Immunol.* 2016;7:279.
91. Ponder KG, Boise LH. The prodomain of caspase-3 regulates its own removal and caspase activation. *Cell Death Discov.* 2019;5:56. doi: 10.1038/s41420-019-0142-1.
92. Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2001;61(3):1227-32.
93. Majchrzak A, Lewandowski F, Hryniewicz R, Poniewierska-Baran A, Bębnowska D, Niedźwiedzka-Rystwej P. Granzyme B and melittin in cancer immunotherapy: molecular mechanisms and therapeutic perspectives in head and neck cancers. *Front Immunol.* 2025;16:1628014.
94. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev.* 2010 ;235(1):93-104.
95. Baran K, Dunstone MA, Chia J, Ciccone A, Browne KA, Clarke CJP, Lukyanova N, Saibil H, Whisstock JA, Voskoboinik I, Trapani JA. The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity.* 2009 May;30(5):684–95.
96. Hurkmans DP, Basak EA, Schepers N, Oomen-De Hoop E, Van der Leest CH, El Bouazzaoui S, Bins S, Koolen SLW, Sleijfer S, Van der Veldt AAM, Debets R, Van Schaik RHN, Aerts JGJV, Mathijssen RHJ. Granzyme B is correlated with clinical outcome after PD-1 blockade in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1):e000586.

97. Fang Y, Herrick EJ, Nicholl MB. A Possible Role for Perforin and Granzyme B in Resveratrol-Enhanced Radiosensitivity of Prostate Cancer. *J Androl.* 2013 Feb;33(4):752–60.
98. Brown K, Awan NA, Le PH, et al. *Histology, Cell Death.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526045/>
99. Khalid N, Azimpouran M. *Necrosis Pathology.* In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>
100. Rehman I, Farooq M, Simpson B. *Genetics, Mitosis.* In: StatPearls . Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482449/>
101. van Amerongen MJ, Engel FB. Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6A):2233-44.
102. Wang Z. *Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview.* *Methods Mol Biol.* 2022;2579:3-23.
103. Pellarin I, Dall'Acqua A, Favero A, Segatto I, Rossi V, Crestan N, et al. Cyclin-dependent protein kinases and cell cycle regulation in biology and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2025;10:11.
104. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Components of the Cell-Cycle Control System. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26824/>
105. Blagosklonny MV, Pardee AB. *The Restriction Point of the Cell Cycle.* In: Madame Curie Bioscience Database. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6318/>
106. Sun Y, Liu Y, Ma X, Hu H. The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6923.
107. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 2022 May;29(5):946-60.
108. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-14.
109. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *J Cancer Sci Ther.* 2019;11(4):97.
110. Bruno PM, Liu Y, Park GY, Murai J, Koch CE, Eisen TJ, Pritchard JR, Pommier Y, Lippard SJ, Hemann MT. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med.* 2017;23(4):461-71.
111. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
112. Radomirović M, Gligorijević N, Stanić-Vučinić D, Rajković A, Ćirković Veličković T. Ultrasensitive Quantification of Crustacean Tropomyosin by Immuno-PCR. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(20):15410.
113. Jevtovic V, Alhar MSO, Milenković D, Marković Z, Dimitrić Marković J, Dimić D. Synthesis, Structural Characterization, Cytotoxicity, and Protein/DNA Binding Properties of Pyridoxylidene-Aminoguanidine-Metal (Fe, Co, Zn, Cu) Complexes. *Int J Mol Sci.*

2023;24(19):14745. doi: 10.3390/ijms241914745. PMID: 37834192; PMCID: PMC10573062.

114. Ballı JN, Gungor O, Kocer F, Kose M. DNA/BSA Binding and Antimicrobial Properties of Biguanide-Cu(II) Complexes. *Chem Biodivers*. 2024;21(11):e202400733.

115. Qin XY, Wang YN, Liu HF, Luo ZH, Zhang PL, Li-Fang H, Liu MR. Anti-cancer activities of metal-based complexes by regulating the VEGF/VEGFR2 signaling pathway and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, and caspase-9 to inhibit angiogenesis and induce apoptosis. *Metallomics*. 2020;12(1):92-103.

116. Sun Q, Li Y, Shi H, Wang Y, Zhang J, Zhang Q. Ruthenium Complexes as Promising Candidates against Lung Cancer. *Molecules*. 2021 Jul 21;26(15):4389.

117. Zeng L, Gupta P, Chen Y, Wang E, Ji L, Chao H, Chen ZS. The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chem Soc Rev*. 2017 Oct 2;46(19):5771-5804.

118. Sonkar C, Sarkar S, Mukhopadhyay S. Ruthenium(ii)-arene complexes as anti-metastatic agents, and related techniques. *RSC Med Chem*. 2021;13(1):22-38.

119. Alessio E, Messori L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules*. 2019;24(10):1995.

120. Radisavljević S, Petrović B. Gold(III) Complexes: An Overview on Their Kinetics, Interactions With DNA/BSA, Cytotoxic Activity, and Computational Calculations. *Front Chem*. 2020;8:379.

121. Yeo CI, Ooi KK, Tiekink ERT. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules*. 2018;23(6):1410.

122. Zhou L, Liu H, Liu K, Wei S. Gold Compounds and the Anticancer Immune Response. *Front Pharmacol*. 2021;12:739481.

123. Ratia C, Sueiro S, Soengas RG, Iglesias MJ, López-Ortiz F, Soto SM. Gold(III) Complexes Activity against Multidrug-Resistant Bacteria of Veterinary Significance. *Antibiotics (Basel)*. 2022 ;11(12):1728.

124. Marques A, Carabineiro SAC, Aureliano M, Faleiro L. Evaluation of Gold Complexes to Address Bacterial Resistance, Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Their Antiviral Properties against Bacteriophages. *Toxics*. 2023;11(11):879.

125. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(9):386-98.

126. Gao L, Zhang A. Copper-instigated modulatory cell mortality mechanisms and progress in oncological treatment investigations. *Front Immunol*. 2023;14:1236063.

127. Frieden E, Hsieh HS. Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1976;44:187-236.

128. Zhang X, Tao T, Qiu Y, Guo X, Zhu X, Zhou X. Copper-mediated novel cell death pathway in tumor cells and implications for innovative cancer therapies. *Biomed Pharmacother*. 2023;168:115730.

129. Asghariazar V, Amini M, Pirdel Z, Fekri R, Asadi A, Nejati-Koshki K, Baradaran B, Panahi Y. The Schiff base hydrazine copper(II) complexes induce apoptosis by P53

overexpression and prevent cell migration through protease-independent pathways. *Med Oncol.* 2023 ;40(9):271.

130. Rezaei A, Khanamani Falahati-Pour S, Mohammadizadeh F, Hajizadeh MR, Mirzaei MR, Khoshdel A, Fahmidehkar MA, Mahmoodi M. Effect of a Copper (II) Complex on The Induction of Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(10):2877-2884.

131. Fu Q, Wu X, Lu Z, Chang Y, Jin Q, Jin T, Zhang M. TMEM205 induces TAM/M2 polarization to promote cisplatin resistance in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2024 Sep;27(5):998-1015. doi: 10.1007/s10120-024-01517-2. Epub 2024 Jun 8. PMID: 38850316; PMCID: PMC11335886.

132. Zhang F, Zhao L, Zhao W, et al. Glucose transporter 1 regulates the proliferation and cisplatin sensitivity of esophageal cancer. *Cancer Sci.* [online ahead of print] Year Month Day; doi:10.1111/cas.13995.

133. Zhu S, Pabla N, Tang C, He L, Dong Z. DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Arch Toxicol.* 2015 Dec;89(12):2197-205. doi: 10.1007/s00204-015-1633-3. Epub 2015 Nov 13. PMID: 26564230; PMCID: PMC4734632.

134. Anwar S, Sarwar T, Khan AA, Rahmani AH. Therapeutic Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase (SOD) in Different Pathogenesis. *Biomolecules.* 2025;15(8):1130.

135. Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, Kuča K, Jaćević V. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science.* 2020;11:552969.

136. Nakamura H, Takada K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* 2021 Oct;112(10):3945-3952.

137. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012;64(3):706-21.

138. Mao X, Wu S, Huang D, Li C. Complications and comorbidities associated with antineoplastic chemotherapy: Rethinking drug design and delivery for anticancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2024;14(7):2901–2926.

139. Krisl JC, Doan VP. Chemotherapy and Transplantation: The Role of Immunosuppression in Malignancy and a Review of Antineoplastic Agents in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation.* 2017;17(8):1974-1991.

140. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci.* 2006;89(2):515-23.

141. 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.

142. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmakologija.* 8. izdanje. Beograd: Data Status; 2019. ISBN 978-86-7478-501-0.

143. Janković SM. *Farmakologija i toksikologija.* Kragujevac: Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu; 2007. ISBN 978-86-7760-026-6.

144. Griffith WP. Bicentenary of Four Platinum Group Metals: Part I: Rhodium and Palladium – Events Surrounding their Discoveries. *Platinum Metals Review.* 2003;47(4):175-83.

145. Czarnomys R, Radomska D, Szewczyk OK, Roszczenko P, Bielawski K. Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8271
146. Scattolin T, Voloshkin V, Visentin F, Nolan S. A critical review of palladium organometallic anticancer agents. *Cell Rep Phys Sci.* 2021;2(6):100446.
147. Zhou M, Boulos JC, Omer EA, Rudbari HA, Schirmeister T, Micale N, Efferth T. Two palladium (II) complexes derived from halogen-substituted Schiff bases and 2-picolylamine induce parthanatos-type cell death in sensitive and multi-drug resistant CCRF-CEM leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2023;956:175980. doi:10.1016/j.ejphar.2023.175980.
148. Alam MN, Moni MA, Yu JQ, Beale P, Turner P, Proschogo N, Rahman MA, Hossain MP, Huq F. Promising Anticancer Activity of [Bis(1,8-quinolato)palladium (II)] Alone and in Combination. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8471.
149. Raković I, Bogojeski J, Mladenović K, Petrović A, Divac V, Mihailović K, Jovčić BP, Kostić M, Canović P, Milivojević N, Zivanović M, Radojević I. Synthesis, Characterization and Biological Studies of Organoselenium trans-Palladium(II) Complexes. *Med Chem.* 2021;17(9):1007-22.
150. Alayyaf, A.A.; Barakat, A.; Al-Majid, A.M.; Ali, M.; Yousuf, S.; Haukka, M.; El-Faham, A.; Soliman, S.M.; Nafie, M.S. Cytotoxicity and Apoptosis-Induction in MCF-7 Cells for New Pd(II) Complex Based on s-Triazine Ligand: Synthesis, Single Crystal X-ray Diffraction Analysis and Structural Investigations. *Crystals* 2023. <https://doi.org/10.3390/cryst13101472>.
151. Pruchnik H, Lis T, Latocha M, Zielińska A, Pruchnik FP. Palladium(II) complexes with tris(2-carboxyethyl)phosphine, structure, reactions and cytostatic activity. *J Inorg Biochem.* 2016;156:14-21.
152. Dutra JL, Honorato J, Graminha A, Moraes CAF, de Oliveira KT, Cominetti MR, Castellano EE, Batista AA. Pd(II)/diphosphine/curcumin complexes as potential anticancer agents. *Dalton Trans.* 2024;53(4):1234–45.
153. Joksimović N, Janković N, Petronijević J, Baskić D, Popovic S, Todorović D, Zarić M, Klisurić O, Vraneš M, Tot A, Bugarčić Z. Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with cisplatin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study. *Med Chem.* 2019: 30686264.
154. Hussain S, Zafar MN, Hussain I, Khan F, Mughal EU, Tahir MN. Preliminary anticancer evaluation of new Pd(II) complexes bearing NNO donor ligands. *Saudi Pharm J.* 2024;32(1):101915. doi: 10.1016/j.jsps.2023.101915.
155. Mbugua SN, Sibuyi NRS, Njenga LW, Odhiambo RA, Wandiga SO, Meyer M, Lalancette RA, Onani MO. New Palladium(II) and Platinum(II) Complexes Based on Pyrrole Schiff Bases: Synthesis, Characterization, X-ray Structure, and Anticancer Activity. *ACS Omega.* 2020 Jun 19;5(25):14942-14954. doi: 10.1021/acsomega.0c00360. PMID: 32637768; PMCID: PMC7330904.
156. Jakovljevic S, Canovic P, Spasic M, Zivkovic M, Zanic M, Zivkovic Zanic R, Franich A, Rajkovic S, Todorovic Z, Relic N, Zivic M, Mirkovic N. DNA/BSA Binding Affinity and Cytotoxicity of Dinuclear Palladium(II) Complexes with Amino Acids as Ligands. *Molecules.* 2025 Mar 30;30(7):1534.
157. Omondi RO, Bellam R, Ojwach SO, Jaganyi D, Fatokun AA. Palladium(II) complexes of tridentate bis(benzazole) ligands: Structural, substitution kinetics, DNA interactions and

cytotoxicity studies. *J Inorg Biochem.* 2020;210:111156. doi:10.1016/j.jinorgbio.2020.111156.

158. Valentini A, Conforti F, Crispini A, De Martino A, Condello R, Stellitano C, Rotilio G, Ghedini M, Federici G, Bernardini S, Pucci D. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells. *J Med Chem.* 2009;52(2):484-91.

159. Ulukaya E, Frame FM, Cevatemre B, Pellacani D, Walker H, Mann VM, Simms MS, Stower MJ, Yilmaz VT, Maitland NJ. Differential cytotoxic activity of a novel palladium-based compound on prostate cell lines, primary prostate epithelial cells and prostate stem cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e64278.

160. Hassona SM, Saad EA, Kiwan HA, Hassanien MM. Palladium(II) Schiff base complex arrests cell cycle at early stages, induces apoptosis, and reduces Ehrlich solid tumor burden: a new candidate for tumor therapy. *Invest New Drugs.* 2022;40(4):681-689.

161. Li Y, Gu Z, Zhang C, Li S, Zhang L, Zhou G, Wang S, Zhang J. Synthesis, characterization and ROS-mediated antitumor effects of palladium(II) complexes of curcuminoids. *Eur J Med Chem.* 2018 Jan 20;144:662-671. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.027. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29289889.

БИОГРАФИЈА

Кандидат др Дамњан Пантић је стекао диплому о високом образовању на Медицинском факултету, Универзитета у Крагујевцу 27.10.2005. године са просечном оценом 8.54. Специјалистичке студије на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу завршио је 29.10.2015. године са одличним успехом и стекао звање специјалисте урологије. Студент је треће године Докторских академских студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу смер Клиничка и експериментална хирургија, а усмени докторски испит је положио 12.07.2013. године са оценом 10. Др Дамњан Пантић има четири рада објављених у научним часописима категорије М20 и један рад објављен у научној часопису категорије М50 где је и први аутор. Од 08.10.2020 запослен је на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу као сарадник у настави за научну област Медицинске науке, ужа научна област Хирургија.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. Stojadinović M, Stojadinović M, **Pantić D**. Decision tree analysis for prostate cancer prediction. *Srp Arh Celok Lek.* 2019;147(1-2):52-58. doi: 10.2298/SARH181127039S. **M23**
2. Stojadinovic MM, **Pantic D**, Anđelkovic M, Stojadinovic MM. Comparison among different p2PSA derivatives on prostate cancer prediction in patients with serum prostate-specific antigen below 10 ng/ml. *Srp Arh Celok Lek.* 2020;148(3-4):160-6. doi: 10.2298/SARH180918106S **M23**
3. Stojadinovic M, Vukovic I, Ivanovic M, Stojadinovic M, Milovanovic D, **Pantic D**, Jankovic S. Optimal threshold of the prostate health index in predicting aggressive prostate cancer using predefined cost–benefit ratios and prevalence. *International Urology and Nephrology.* 2020;52:893-901. doi: 10.1007/s11255-019-02367-z. **M23**
4. **Pantic DN**, Stojadinovic MM, Stojadinovic MM. Decision Tree Analysis for Prostate Cancer Prediction in Patients with Serum PSA 10 ng/ml or Less. *Experimental and Applied Biomedical Research (EABR).* 2020;21(1):43-50. doi: 10.2478/sjecr-2018-0039 **M51**
5. **Pantic D**, Mirkovic N, Vulovic T, Jovanovic D, Jakovljevic S, Canovic P, Zaric M, Zaric RZ, Kostic M, Dragojevic J, Divac V, Milanovic Z, Milisavljevic K, Mitrovic M, Zelen I. Evaluation of newly synthesized schiff base Pd(II) complexes for prostate cancer treatment through *in vitro* cytotoxicity and molecular mechanistic studies. *Front Chem.* 2025 Jul 17;13:1636477. doi: 10.3389/fchem.2025.1636477. **M21**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:


„ Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) са Шифовим базама изведеним од салицил-алдехида на ћелије карцинома простате 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, 14.11.2025. године .



потпис аутора

Образац 2

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

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

**„Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) са
Шифовим базама изведеним од салицил-алдехида на ћелије карцинома простате
in vitro”**

истоветне.

У Крагујевцу, 14. 11. 2025. године .



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Дамњан Пантић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„Испитивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса паладијума(II) са Шифовим базама изведеним од салицил-алдехида на ћелије карцинома простате in vitro”

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу , 14.11.2025 . године,



потпис аутора

²Молимо 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/>