



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Саша А. Бабић

**Антитуморски ефекат бакар(II) комплекса са
азот-кисеоничним донорским лигандима на
ћелије мултиформног глиобластома *in vitro***

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Saša A. Babić

**Antitumorski efekat bakar(II) kompleksa sa azot-
kiseoničnim donorskim ligandima na ćelije
multiformnog glioblastoma in vitro**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2026.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Saša A. Babić

**Antitumor effect of copper(II) complexes with
nitrogen-oxygen donor ligands on glioblastoma
multiforme cells in vitro**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2026.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Саша Бабић
Датум и место рођења: 26.08.1977.године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: психијатар, УКЦ Крагујевац, Клиника за психијатрију
Докторска дисертација
Наслов: Антитуморски ефекат бакар(II) комплекса са азот-кисеоничним донорским лигандима на ћелије мултиформног глиобластома <i>in vitro</i>
Број страница: 82
Број слика: 3 слике, 3 табеле и 15 графикана
Број библиографских података: 178
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
Коментор: Др Марина Костић виши научни сарадник Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: број IV-03-8/17 од 22.01.2025. године

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Saša Babić
Datum i mesto rođenja: 26.08.1977.godine Kragujevac
Sadašnje zaposlenje: psihijatar, UKC Kragujevac, Klinika za psihijatriju
Doktorska disertacija
Naslov: Antitumorski efekat bakar(II) kompleksa sa azot-kiseoničnim donorskim ligandima na ćelije multifornog glioblastoma in vitro
Broj stranica: 82
Broj slika: 3 slike, 3 grafika i 15 grafikona
Broj bibliografskih podataka: 178
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
Komentor: Dr Marina Kostić viši naučni saradnik Instituta za informacione tehnologije Univerziteta u Kragujevcu
Broj i datum odluke veća Univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije: broj IV-03-8/17 od 22.01.2025. godine

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Sasa Babic
Date and place of birth: 26.08.1977. year
Current employment: psychiatrist, University Clinical Center Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Antitumor effect of copper(II) complexes with nitrogen-oxygen donor ligands on glioblastoma multiforme cells in vitro
No. of pages: 82
No. of images: 3 pictures, 3 graphics and 15 charts
No. of bibliographic data: 178
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDC): Medical sciences
Mentor: Prof. Dr Petar Canovic, Associate Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, a narrow scientific field of Medical Biochemistry
Commentor: Dr. Marina Kostić, senior research associate at the Institute of Information Technologies, University of Kragujevac
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
Number IV-03-8/17 from 22.01.2025.

ЗАХВАЛНИЦА

Од када је Асклепије, Бог медицине узвикнуо да се лекар не постаје него вечно настаје, и пресекао мисао својим чувеним штапом који од свих штапова једини има крај за почетак, ето и мене на једној од степеница настанка. На овој степеници прво се захваљујем свим мојим пацијентима који су ми обезбедили време да на њој будем. Хераклит каже да нема већег државног непријатеља од лошег учитеља. Имао сам част и прилику да учим од најбољих, неизмерно захвалан свом ментору Проф. др Петру Чановићу који ме је погурао тим степеницама као и свима осталима који су прискакали и помагали када бих застао, или Миња и Бане који би ме придржавали на степеницама без краја.

САЖЕТАК

Мултиформни глиобластом представља најчешћи и најагресивнији примарни тумор централног нервног система са просечним преживљавањем од момента постављања дијагнозе 15 месеци. Стандарна терапија мултиформног глиобластома подразумева хирушку интервенцију, радиотерапију и хемиотерапију. Од цитостатика користи се темозоломид, нежељена дејства овог лека су последица неселективности, па се може јавити супресија коштане сржи, кардиотоксичност, хепатотоксичност, нефротоксичност. Из претходно наведених чињеица, можемо закључити да би развитак потенцијалних цитостатика могао да помогне у ефикаснијој терапији мултиформног глиобластома.

Циљ овог истраживања јесте испитивање антитуморског дејства новосинтетисаних бакар(II) једињења на туморске ћелијске линије *U251*, *HeLa* и *HCT116*, као и на малиго неизмењене фибробласте *MRC-5*. Синтетисана једињења бакра *Cu1* и *Cu2* су демонстрирала сигнификантан антиканцерски ефекат на тестираним *HCT116*, *HeLa*, *U251* ћелијама уз велики степен селективности према малигно неизмењеним ћелијама фибробластима.

Снажан цитотокични ефекат два једињења бакра на ћелије мултиформног глиобластома је постигнут индукцијом ране апоптозе, променом односа Bcl2/Bax молекула.

Примењени бакарни комплекси доводили су до нарушавања нормалног протока ћелијског циклуса у канцерским *U251* ћелијама, што је резултирало значајним смањењем стопе њиховог преживљавања.

Кључне речи: мултиформни глиобластом, апоптотска ћелијска смрт, ћелијска деоба, канцерогенеза, протеини апоптозе, једињења бакра

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme represents the most common and aggressive primary tumor of the central nervous system, with an average survival of 15 months from the time of diagnosis. Standard therapy for glioblastoma multiforme includes surgical intervention, radiotherapy, and chemotherapy. Among cytostatics, temozolomide is commonly used; however, the adverse effects of this drug result from its non-selectivity, which may lead to bone marrow suppression, cardiotoxicity, hepatotoxicity, and nephrotoxicity. Based on these facts, it can be concluded that the development of potential cytostatics could contribute to more effective therapy for glioblastoma multiforme.

The aim of this study was to investigate the antitumor activity of newly synthesized copper(II) compounds on tumor cell lines U251, HeLa, and HCT116, as well as on non-malignant fibroblasts MRC-5. The synthesized copper compounds Cu1 and Cu2 demonstrated a significant anticancer effect on the tested HCT116, HeLa, and U251 cells, with a high degree of selectivity toward non-malignant fibroblast cells.

The strong cytotoxic effect of the two copper compounds on glioblastoma multiforme cells was achieved through the induction of early apoptosis and alteration of the Bcl2/Bax molecular ratio. The applied copper complexes also led to disruption of normal cell cycle progression in cancerous U251 cells, resulting in a significant reduction in their survival rate.

Keywords: glioblastoma multiforme, apoptotic cell death, cell division, carcinogenesis, apoptosis-related proteins, copper compounds

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
МАЛИГНА ТРАНСФОРМАЦИЈА ЋЕЛИЈЕ	2
ТУМОР-СУПРЕСОРСКИ ГЕНИ.....	4
ОНКОГЕНИ.....	5
АПОПТОЗА.....	6
СПОЉАШЊИ АПОПТОТСКИ ПУТ, РЕЦЕПТОР СМРТИ.....	7
УНУТРАШЊИ МИТОХОНДРИЈАЛНИ ПУТ	10
МИТОХОНДРИЈАЛНИ КАСПАЗА НЕЗАВИСНИ ПУТ АПОПТОЗЕ	13
НЕКРОПТОЗА	13
АНТИКАНЦЕРСКИ ЛЕКОВИ	13
КОМПЛЕСКИ МЕТАЛА	14
БАКАР.....	17
КОМПЛЕКСИ БАКРА	18
ЦИСПЛАТИНА	19
КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ	21
МАЛИГНИТЕТ ЦЕРВИКСА.....	22
МУЛТИФОРМНИ ГЛИОБЛАСТОМ	23
АСТРОЦИТОМИ ГРАДУСА IV	23
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	27
ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	29
МТТ ТЕСТ	30
<i>ANNEXIN V/PI ТЕСТ</i>	31
ДЕТЕКЦИЈА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА	31
АНАЛИЗА АПОПТОТИЧНИХ ПРОТЕИНА.....	32
СТАТИСТИКА.....	33
4. РЕЗУЛТАТИ.....	34
УТИЦАЈ <i>Cu(II)</i> ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ <i>HeLa</i> ЋЕЛИЈА.....	35
УТИЦАЈ <i>Cu(II)</i> ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ <i>HCT 116</i> ЋЕЛИЈА.....	41
УТИЦАЈ <i>Cu(II)</i> ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ <i>U251</i> ЋЕЛИЈА.....	47
УТИЦАЈ <i>Cu(II)</i> ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ <i>MRC-5</i> ЋЕЛИЈА.....	53

ДЕЈСТВОМ $Cu(II)$ ЈЕДИЊЕЊА ИНДУКУЈЕ СЕ АПОПТОТСКИ ОДГОВОР У МАЛИГНИМ ЋЕЛИЈАМА МУЛТИФОРМНОГ ГЛИОБЛАСТОМА	60
ДЕЛОВАЊЕ КОМПЛЕКСА БАКРА НА ФАЗЕ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА ИСПИТИВАНИХ ТУМОРСКИХ ЋЕЛИЈА	62
КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ПОКРЕЋУ АПОПТОЗУ АКТИВИРАЊЕМ МИТОХОНДРИЈАЛНОГ ПУТА	64
5. ДИСКУСИЈА.....	66
6. ЗАКЉУЧАК	71
РЕФЕРЕНЦЕ	73

1. УВОД

МАЛИГНА ТРАНСФОРМАЦИЈА ЋЕЛИЈЕ

Сама малигна алтерација је заправо вишестепени и сложен процес. Есенцијалну улогу у малигној трансформацији ћелије има сама генетика и промене у молекулу ДНК (мутације). Етиологија настанка канцера укључује мутацију гена који контролишу метаболизам ћелије, апоптозу и поправку ДНК молекула. Такође, треба напоменути да епигенетичке измене као што су ДНК метилација могу индуковати малигну трансформацију. Сам статус микрооколине ћелије (хронична упала, хипоксија) могу допринети активном развоју тумора (1, 2, 3).

Малигно неизмењене ћелије енергију генеришу процесом који називамо оксидативна фосфорилација и производња енергије се одиграва у митохондријама. Угљени хидрати, глукоза се процесом гликолизе конвертује у пируват, који ће бити супстрат за процес који називамо оксидативна декарбоксилација. Оксидативном декарбоксилацијом од пирувата стварамо ацетил КоА даље улази у циклус трикарбоксилних киселина (Кребсов циклус), а све у циљу добијања енергије. Свим ћелијама је неопходна енергија због одржавања хомеостазе (4).

Када говоримо о малигно трансформисаним ћелијама њима је неопходна већа количина енергије у односу на малигно неизмењене ћелије због убрзаног раста и ћелијске деобе. Прецизније, малигне ћелије имају могућност убрзаног преузимања глукозе, при чему се од створеног пирувата ствара повећана количина лактата (пируват се редукује у латат, реакција је реверзибилна) услед појачане ензимске активности *LDH* (лактат дехидрогеназа) (5). Стварања лактата од пирувата се дешава процесом који називамо анаеробна гликолиза. Иако постоји потпуно функционалан митохондријски метаболизам анаеробна гликолиза је процес који генерише стварање енергије код канцерских ћелија (5, 6). Овакав вид метаболизма код канцерских ћелија називамо *Warburgov* ефекат. Повећана продукција онкомаболита лактата, фумарата и сукцината је до есенцијалног значаја за одвијање метаболизма канцерских ћелија, односно њихову пролиферацију (6). Повећана продукција лактата ће активирати сигнални пут *NF-κB/IL-8* који од есенцијалног значаја за ендотелне ћелије и доћи ће до развоја ангиогенезе и формирања нових крвних судова. Осим канцерских ћелија *CAF's* ћелије (енг. *cancer-associated fibroblasts*) имају могућност повећана продукције лактата. Вишак произведеног лактата даље улази у малигно измењене ћелије преко транспортера *MCT-1* (енг. *monocarboxylate transporter 1*) (7). Овај метаболички пут лактата називамо „обрнут *Warburgov* ефекат“ (енг. *reverse Warburg effect*). Метаболички пут „обрнут *Warburgov* ефекат“ омогућава канцерским ћелијама да генеришу енергију независно од присуства глукозе. Канцерске ћелије могу користити глутамин као извор енергије што ће условити накупљање цитрата и малата, а све у циљу повећане синтезе нуклеотида који су есенцијални за пролиферацију и ћелијску деобу (8, 9).

Осим угљених хидрата, липиди имају есенцијалну улогу у малигној трансформацији односно самом метаболизму канцерске ћелије. Малигне ћелије повећавају експресију рецептора за унос масних киселина, а осим тога одиграва се и *de novo* синтеза масних киселина. Одим тога, у малигној ћелији одвијају се процеси β -оксидација масних киселина као и депоновање липида. Интензивна липогенеза канцерских ћелија повећава синтезу и степен активности ензима *FAS-a* (енг. *fatty acid synthase*) што ће даље условити избегавање процеса апоптозе и миграцију ћелија (10, 11). Ензими као што су адипозна липаза, хормон-сензитивна липаза и

моноацилглицерол липаза доприносе канцерогенези. Активност ових липаза повећава брзину протока електрона при чему се ствара повећана количина реактивних кисеоничних врста који ће олакшати прогресију тумора (12, 13).

Метаболизам беланчевина у канцерској ћелији подразумева повећану синтезу туморских протеина, стога је неопходна доступност повећаних количина аминокиселина. Једна од кључних аминокиселина за метаболизам малигно трансформисаних ћелија је глутамин. Глутамин представља донор азота за синтезу нуклеотида (пурина, пиримидина) као и кофактора *NAD* (14, 15). Повећан унос глутамина у канцерску ћелију је омогућен присуством специфичног транспортера *SLC1A5* чија је локација на плазма мембрани. Аминокиселина глутамин је прекурсор интермедијера циклуса трикарбоксилних киселина. Осим глутамина, за метаболизам канцерске ћелије од великог је значаја и присуство аминокиселине аргинин (14, 15, 16).

Фактор *TGF-β* (енг. *transforming growth factor-beta*) има есенцијалну улогу у малигној трансформацији ћелије. Када говоримо о физиолошким условима *TGF-β* има улогу у миграцији, пролиферацији и апоптози ћелије (17). Поремећај у регулацији синтезе овог фактора може довести до активног развоја туморогенезе и различитих имунских поремећаја. Када говоримо о туморогенези *TGF-β* стимулише развој нових крвних судова (поспешује ангиогенезу) и „избегавање имуноког надзора“. Све ово за последицу има повећану инвазивност и „преживљавање“ канцерских ћелија (17, 18). Даље, *TGF-β* индиректно преко различитих сигналних метаболичких путева (*PI3K/AKT* и *p38 MAPK*) доводи до повећане експресије транспортера за глукозу *GLUT1* (19).

Хипоксија као окружење значајно утиче на туморогенезу. Прецизније хипоксија доводи до експресије *HIF-a* (енг. *hypoxia-inducible factors*) који ће активирати гене за ангиогенезу и туморску инвазију. Многе студије сматрају да на самом почетку развоја тумору есенцијалну улогу имају транскрипциони фактори *HIF-1α* и *HIF-2α*. Стога, уколико дође до инактивирања тумор-супресорског гена *VHL* (енг. *Von Hippel-Lindau*) који је одговоран за разградњу *HIF-1α* и *HIF-2α* у присуству кисеоника, може доћи до малигне трансформације (20, 21).

Малигне промене подразумевају и промењен хемијски састав плазма мембране при чему се мења активност ензима и транспортера који су ту локализовани, а истовремено се смањује адхезивност (22). Даље, код канцерских ћелија долази до појачаног отпуштања протеолитичких ензима (катепсин Б) као и промењене фосфорилације регулаторних ензима. Све ово погодује настанку секундарних депозита (23). Осим тога код малигнућ ћелија се пентозофосфоатни пут одиграва интензивније у односу на малигно нетрансформисане ћелије стога је појачана активност регулаторног ензима овог процеса гликозо-6-фосфат дехидрогеназе. Производи овог метаболичког пута су редукована коензимска форма $NADPH+H^+$ и рибоза-5 фосфат. Коензимска форма $NADPH+H^+$ је неопходна за анаболичке путеве као што су синтеза липида и холестерола. Такође, ова коензимска форма има улогу у антиоксидативној заштити. Рибоза-5 фосфат се користи за синтезу нуклеотида. Можемо закључити да овај пут када говоримо о канцерским ћелијама има есенцијалну улогу у антиоксидативној заштити и појачаној синтези нуклеотида (24, 25).

Категорија (метаболички пут, енергија)	Малигно неизмењена ћелија	Малигна ћелија
Гликолиза	Аеробна гликолиза	Warburg-ов ефекат, анаеробна гликолиза
Глутамин и аминокиселине	Физиолошки метаболизам	Повећан унос глутамина (<i>SLC1A5</i> транспортер)
Метаболизам липида	Унос масних киселина и β -оксидација у нормалним количинама	Повећан унос масних киселина, <i>de novo</i> синтеза липида
Метаболизам протеина	Физиолошки метаболизам	Појачана синтеза протеина, неопходан већи унос аминокиселина због брзе пролиферације
Пентозофосфатни пут	Производи <i>NADPH</i> за редукцију и рибозу-5-фосфат за нуклеотиде	Интензивнији; <i>NADPH</i> користи се за синтезу липида и антиоксидативну заштиту, рибоза-5-фосфат за нуклеотиде
Енергетска зависност	Зависи од нормалног метаболизма угљених хидрата, липида и протеина	Малигне ћелије могу користити глутамин и лакат као енергетске изворе (енг. <i>reverse Warburg effect</i>)

Табела 1. Метаболизам малигно неизмењене и канцерске ћелије

ТУМОР-СУПРЕСОРСКИ ГЕНИ

У туморогенези губитак или инактивација тумор-супресорских гена има есенцијалну улогу. Транскрипциони фактор и тумор супресор *p53* је најчешће мутрани ген када говоримо о малигнитетима. Протеин *p53* има улогу транскрипционог фактора у ћелији који се везује за молекулу ДНК и регулише процес апоптозе, ћелијски циклус, поправку ДНК молекула као и неке метаболичке процесе (26, 27). Прецизније, *p53* инхибира транскрипцију *GLUT1* и *GLUT4* транспортера, такође инхибира синтезу гликолитичких ензима *HK2* (хексокиназа 2), *PGM1* (фосфоглицерат мутаза 1) и *PDK2* (пируват дехидригеназа 2). Можемо закључити да *p53* смањује допремање глукозе и инхибира процес гликолизе чиме ћелију енергетски ограничава. Уколико дође до мутације *p53*, доћи ће до појачане гликолизе, појачаног одивјања пентозофосфатног пута и повећане липидне метаболичке активности што погодује канцерогенези (28, 29).

Протеин *LKB1* (енг. *liver kinase B1*) кодира ген *STK11* (енг. *serine/threonine kinase 11*). Овај молекул је серин/треонин киназа, има улогу тумор супресора при чему регулише одвијање ћелијског метаболизма и деобу (30). Током хипоксије и нутритивног дефицита у ћелијама долази до активације *LKB1-AMPK* пута што ће условити појачане катаболичке процесе који имају за циљ производњу енергије (АТФ). Метаболички процеси који генеришу енергију су гликолиза и β -оксидација масних киселина. Треба напоменути да активацијом *LKB1-AMPK* пута долази до инхибиције

анаболичких путева где је неопходан висок утрошак АТП (синтеза протеина, холестерола и масних киселина). Губитак *LKB1* резултује повећан унос глукозе и глутамина и може допринети развоју туморксе ћелије (31, 32).

Тумор супресор туберин или *TSC2* (енг. *tuberous sclerosis complex 2*) је значајан као главни негативни регулатор *mTOR* (енг. *mechanistic Target of Rapamycin*) сигналног пута (33). Сигнални пут *mTOR* је од есенцијалног значаја у регулацији метаболизма и пролиферације ћелија. Губитак или мутација *TSC2* условљава повећану активност сигнални пута *mTOR* и смањену фосфорилацију *AKT-a*. Повећана активност *mTOR* метаболичког пута промовише канцерогенезу кроз повећану пролиферацију као и „преживљавање“ малигнућ ћелија (34, 35).

Два генска локуса *BRCA1* и *BRCA2* кодирају протеине који су од есенцијалног значаја за репарацију грешака у молекулу ДНК. Уколико додђе до мутација постоји могућност развоја агресивних типова карцинома дојке и јајаника. Такође, *BRCA2* мутације повезујемо са канцером панкреаса и простате. Локација *BRCA1* се налази на хромозому *17q21*, док се *BRCA2* налази на хромозому *13q12.3*. Откривање мутација у овим генима даје јасну процену ризика од настанка малигнитета (36, 37, 38).

ОНКОГЕНИ

Онкогени су гени који могу индуковати малигну трансформацију ћелија и развој тумора. У физиолошким условима називамо их прото-онкогенима који имају есенцијалну улогу у контроли пролиферације и деобе ћелије.

Онкоген *MYC* („*supertranscription factor*“) игра веома значајну улогу у туморогенези, условљава повећану експресију *GLUT1* транспортера и многих ензима *HK2*, *PFK* и *LDH*. Такође, повећава катаболизам аминокиселине глутамин кроз повећану експресију *ASCT2*. Све ово канцерској ћелији омогућава да има довољно супстрата за анаеробни метаболизам. Овај онкоген има кључну улогу у транспорту масних киселина унутар ћелија као и у оксидативном разлагању истих (39, 40).

Мутације *KRAS* онкогена допреносе развоју малигне ћелије тако што индукују повећан унос глукозе, глутамина и масних киселина. Мутација омогућава повећану експресију *GLUT1* транспортера и повећава се синтеза и каталитичка активност ензима који учествују у процесу гликолизе. Осим тога, повећана је синтеза ензима пентозофосфатног пута. Такође, *KRAS* омогућава одвијање алтернативног пута коришћења глутамина кроз регулацију ензимске активности *GOT* (глутамин-оксалоацетат трансминазе) и *GLUD1* (глутамат дехидрогеназа 1) (41, 42, 43).

Мутације *EGFR* (енг. *Epidermal Growth Factor Receptor*) имају кључну улогу у активацији различитих сигналних путева чији је циљ пролиферација ћелија (44). Прецизније, интензивира се процес гликолизе, такође повећава се активност пентозофосфатног пута и синтезе нуклеотида. Осим тога мутација *EGFR* повећава експресију *GLUT1* транспортера (45).

Можемо закључити да приликом прекомерне активације онкогена може доћи до убрзане ћелијске пролиферације. Међутим, то може да индукује „стрес“ у самој ћелији и она улази у стање сенесценције или *OIS* (енг. *oncogene-induced senescence*). У оваквом стању ћелије могу да луче различите факторе *SASP* (енг. *senescence-associated secretory phenotype*) који могу и не морају допринети прогресији тумора. Уколико се на пример луче фактори као што су *VEGF*, *IL-8*, *IL-6*, ови медијатори могу да подстакну канцерогенезу (46, 47, 48)

АПОПТОЗА

Апоптоза, некроза и аутофагија представљају различите облике „ћелијске смрти“ који се могу јавити као одговор на физиолошке тако и патолошке стимулусе. До сада је идентификован велики број молекула који учествују у сигналним путевима активације апоптозе и аутофагије. Процес апоптозе (програмиране ћелијске смрти) је индивидуалан и селективан при чему не долази до инфламаторног одговора. Стога, апоптоза је физиолошки процес који карактерише смањење величине ћелије, формирање везикула и кондензација језгра (49, 50). Апоптоза је од есенцијалног значаја у контроли органогенезе током ембрионалног развоја и одржавања хомеостазе у свим ткивима. Термин апоптоза је први пут уведен 1972. године од стране Кер и сарадника (*Kerr et al.*), префикс *apo* значи „одвојено или споља“, а *ptosis* „опадање“ (51). У процесу апоптозе есенцијалну улогу имају каспазе (фамилија цистеин протеаза). Осим апоптозе, ове цистеин протеазе имају улогу у диференцијацији пролиферацији и миграцији ћелија. Дакле, апоптоза је облик програмиране ћелијске смрти који може бити условљен старењем ткива и ћелија, а може настати и као одговор на различите спољашње стимулусе (нпр. јонизујуће зрачење и хемиотерапеутска средства). Процес омогућава елиминацију већ оштећених ћелија, при чему ћелије самостално спорводе апоптозу. Прецизније, апоптоза се активира када ћелија изгуби своју физиолошку функцију и достигне „тачку без повратка“ (52, 53). У самом процесу апоптозе разликујемо два стадијума. Први стадијум подразумева активацију сигналних путева који за циљ имају поправку оштећених ћелијских структура. Уколико први стадијум није успешан, ћелија улази у други стадијум, фазу егзекуције где се јављају структурне промене које воде ка ћелијској смрти. Прецизније, у другој фази долази до нарушавања цитоскелета, хроматин се кондензује и фрагментира, мења се наелектрисање ћелијске мембране, губи се интегритет плазма мембране док се мембрански потенцијал митохондрија смањује. Долази до формирања апоптотских тела која сада преузимају макрофаги. У току фазе егзекуције апоптозе нема инфламаторног одговора (54, 55).

Каспазе синтетишемо као неактивне прекурсоре (зимогене молекуле) и молекулске масе су 30–50 *kDa*. Уколико дође до одговарајуће стимулације зимогени прекурсори се конвертују у активне форме. Основна подела каспаза подразумева две врсте ових молекула: иницијаторске каспазе (каспазе-2, 8, 9 и 10) и ефекторске каспазе (каспазе-3, 6 и 7) (56). Иницијаторске каспазе се активирају као одговор на ћелијски стрес или оштећење ћелије док ефекторске каспазе доводе до протеолизе ћелијских структура и апоптозе (57). Активација каспаза се одиграва унутрашњим (митохондријалним) или спољашњим путем апоптозе, а приликом активације оба пута присутне су ефекторске каспазе. Када говоримо о самом иницирању процеса апоптозе током покретања спољашњег пута апоптозе активира се иницијаторска каспаза-8 (55, 57). Насупрот томе, при покретању унутрашњег (митохондријалног пута) активира се иницијаторска каспаза-9. Након каскадних реакција у процесу апоптозе и активирања ефекторске каспазе-3 процес је иреверзибилан (58).

Из претходно наведених чињеница можемо закључити да индукција апоптозе се остварује кроз два алтернативна пута. Спољашњи пут подразумева присуство „рецептора смрти“ на плазма мембранама ћелија, док је митохондријални пут (унутрашњи) последица оштећења ДНК молекула, оксидативног стреса као и промене у самом метаболизму ћелије (59, 60).

Осим проапоптотских молекула важно је напоменути да *IAPs* протеини (енг. *Inhibitors of apoptosis proteins*) могу инхибирати процес програмиране ћелијске смрти селективном, иреверзибилном инхибицијом каспазе-3 и каспазе-7 (61). Протеин *XIAP* (енг. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) је најбоље проучен молекул који спада у фамилију *IAPs* протеина. Овај протеин има могућност да инхибира ефекторске и иницијаторске каспазе. Повећана концентрација овог протеина у туморским ћелијама значајно доприноси развоју резистенција на терапију (62, 63).

СПОЉАШЊИ АПОПТОТСКИ ПУТ, РЕЦЕПТОР СМРТИ

Спољашњи пут апоптозе је индукован везивањем одговарајућих лиганда за „рецепторе смрти“ чија је локализација на плазма мембрани ћелије. Рецептори смрти у структурном погледу поседују екстрацелуларне домене богате цистеином. Када говоримо о цитосолној регији сви рецептори смрти имају „домен смрти“, (енг. *DD, death*

domain). Домен смрти има могућност сигнализације и активације адаптерских молекула који активирају каспазу-8, а као крајњи резултат активираће се ефекторска каспаза-3. Досада детектовани рецептори смрти су *Fas (CD95/APO1)*, *TNF-R1*, *TRAIL-R (DR4/DR5)* (64, 65, 66).

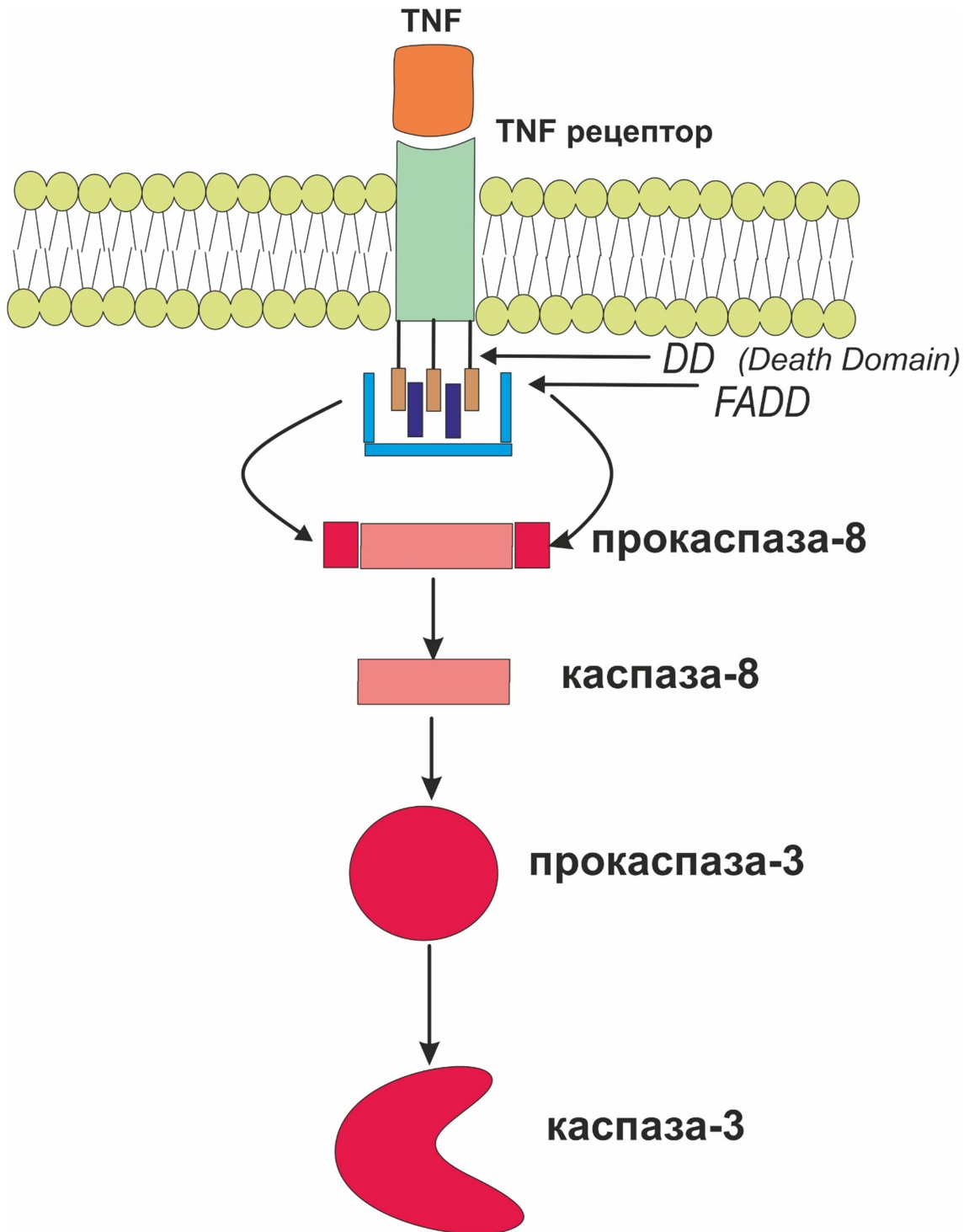
PS (фосфатидилсерин) је структурна компонента ћелијске мембране. Прецизније, фосфолипид који је локализован у унутрашњем делу плазма мембране код малигно нетрансформисаних (здравих) ћелија. Међутим, када дође до траслокације фосфатидилсерина, односно локализација се налази на спољашњој страни плазма мембране, то делује као сигнал за фагоците. Прецизније, фагоцити препознају апоптотски измењену ћелију, уклањају је без стварања инфламаторних цитокина (67).

Fas(APO-1/CD95) је протеин који је локализован на плазма мембрани, молекулска маса износи *40 kDa*. Повећана експресија овог рецептора је присутна у Т лимфоцитима и активираним *NK* ћелијама (енг. *natural killer cells*) (68). У циљу активације *Fas(APO-1/CD95)* рецептора неопходно је везивање одговарајућег лиганда *FasL*. Домени смрти *Fas* рецептора активирају адапторске протеине, а затим долази до активације каспазе-8, каспазе-10 при чему се формира сигнални комплекс *DISC* (енг. *Death-Inducing Signaling Complex*) (69, 70). Даље каскадне реакције воде ка активацији егзекуторских каспаза и апоптози. Активација *Fas/FasL* је од есенцијалног значаја у елиминацији Т и Б лимфоцита, ћелија које су инфициране вирусом и канцерских ћелија. Хемиотерапеутици као што су доксорубин и метотрексат активирају овај апоптотски пут (*Fas/FasL* систем) и тиме доводе до активације апоптозе малигнућ ћелија (71).

Протеин *TNF-α* је трансмембрански протеин који има есенцијалну улогу у инфламаторном одговору, регулацији имунских ћелија и цитотоксичности. *TNF-α* има могућност везивања за *TNF-R1* рецептор (енг. *tumor necrosis factor receptor 1*) који је познат и као *DR1* (енг. *death receptor 1*). Осим тога, *TNF-α* се може везати за *TNF-R2* рецептор (енг. *tumor necrosis factor receptor 2*). Рецептор *TNF-R1* се може наћи у свим ћелијама, док се *TNF-R2* налази најчешће у имунским и ендотелним ћелијама. Активацијом *TNF-R1* адапторски протеин *FADD* (енг. *Fas-Associated protein with Death Domain*) се веже за рецептор што омогућава активирање иницијаторске каспазе (72, 73).

Трансмембрански протеин *TRAIL* (енг. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) је експримиран на површини Т лимфоцита, макрофага и *NK* ћелија. Протеин *TRAIL* се

везује за два рецептора смрти, *DR4* и *DR5*. ово везивање покреће активацију спољашњег апоптоског пута (74,75).



Слика 1. Каскадна реакција у спољашњем апоптотоском путу

УНУТРАШЊИ МИТОХОНДРИЈАЛНИ ПУТ

Активација унутрашњег митохондријалног пута се одиграва унутар саме ћелије и представља одговор на оштећење саме ћелије (оштећење ДНК молекула, недостатак кисеоника, оксидујућа срдства, лекови итд). Прецизније, за одигравање унутрашњег митохондријалног пута апоптозе неопходно је да се митохондријални молекули ослободе у цитосол (сигнал који покреће каскадну реакцију) (76, 77).

Цитохром *c* је протеин који има есенцијалну улогу у процесу оксидативне фосфорилације (у електронском транспорту). Овај протеин је хидросолубилни молекул који је локализован у међумембранском простору митохондрија (78). Цитохром *c* се може користити као биомаркер процеса апоптозе. Након што се цитохром *c* ослободи из митохондрија у цитосол, долази до везивања овог молекула за *Apaf1* (енг. *protease-activating factor-1*) (79). Даље, долази до олигомеризације *Apaf-1* и формирања апоптозома. Ова структура даље активира прокаспазу-9 у каспазу 9 и даље се настављају реакције које ће условити активацију каспазе-3 и индукцију апоптозе (80).

Bcl-2 фамилија протеина контролише односно регулише цео процес унутрашњег митохондријалног пута. Ови протеини имају есенцијалну улогу у регулацији пермеабилности спољашње митохондријалне мембране. У својој структури *Bcl-2* протеини садрже најмање један *BH* домен (*BH1*, *BH2*, *BH3* и *BH4*), па их класификујемо на основу функције и саме структуре. Постоје антиапоптотски *Bcl-2* протеини (садрже *BH1-BH4* домен), проапоптотски (садрже *BH1*, *BH2* и *BH3*) и проапоптотски који садрже само *BH3* домен (81, 82).

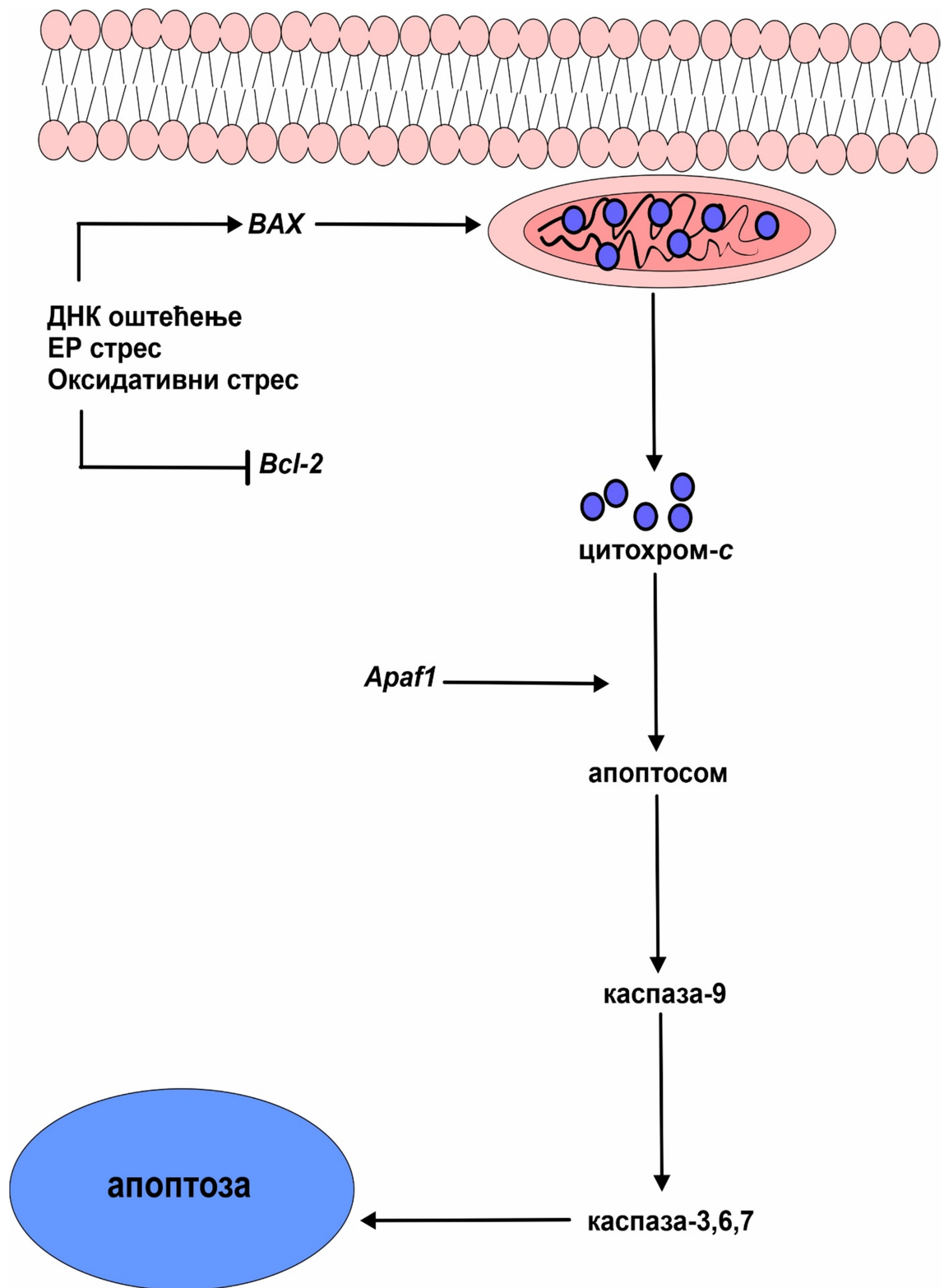
Антиапоптотски *Bcl-2* протеини *Mcl-1*, *Bcl-w*, *A1* и *Bcl-XL* су локализовани на цитосолној страни спољашње митохондријалне мембране и ендоплазматског ретикулума где имају улогу у одржавању интегритета мембране. Можемо закључити да претходно поменути протеини инхибирају апоптозу и промовишу ћелијско преживљавање (82).

У проапоптотске *Bcl-2* протеине спадају *Bim*, *Bad*, *Bid*, *Noxa* и *PUMA*. Од есенцијалног значаја је када говоримо о активацији апоптозе присутност *BH3* домена (83). Даље, проапоптотски *Bak* протеин (*BH1-BH3*) је чврсто везан са спољашњу митохондријалну мембрану чак и у случају изостанка апоптотског сигнала. Насупрот томе, проапоптотски *Bax* протеин (*BH1-BH3*) је локализован примарно у цитосолу ћелије и транслоцира се до спољашње митохондријалне мембране само уколико постоји апоптотски сигнал (84). Као одговор на оштећење ћелије, *Bak* и *Bax* могу деловати на ендоплазматски ретикулум што ће условити повећаним ослобађањем Ca^{2+} из ендоплазматског ретикулума у цитосол (85). На спољашњој митохондријалној мембрани *Bax* и *Bak* формирају митохондријалне апоптотске поре, а кроз ове поре долази до ослобађања протеина из митохондрија (цитохром *c*, *Smac/DIABLO*) (86).

Протеин *Smac/DIABLO* (енг. *Second mitochondria-derived activator of caspase*) након што напусти митохондрије и нађе се у цитотлу везује се за *IAPs* протеине (*XIAP*, *c-IAP1* и *c-IAP2*) инхибира њихову активност и тиме омогућава активацију унутрашњег апоптотског пута (87).

Карактеристике апоптозе	Спољашњи апоптотски пут	Унутрашњи апоптотски пут (митохондријални)
Иницијални сигнал	Екстрацелуларни	Интрацелуларни
Сигнал за активацију	Лиганд-рецептор интеракција (нпр. <i>FasL-Fas</i>)	ДНК оштећење, оксидативни стрес, хипоксија
Каспазе	Каспаза-8 (иницијаторска) активира каспазе-3, -6, -7 (ефекторске)	Каспаза-9 (иницијаторска) активира каспазе-3, -6, -7 (ефекторске)
Протеини који се ослобађају из митохондрија	/	Цитохром <i>c</i> , <i>Smac/DIABLO</i> , <i>AIF</i> и <i>EndoG</i>
Последица	Активација каспаза	Каспаза-зависна или каспаза-независна

Табела 2. Разлика у карактеристикама спољашњег и унутрашњег апоптотског пута



Слика 2. Унутрашњи митохондријални пут, цитохром-с

МИТОХОНДРИЈАЛНИ КАСПАЗА НЕЗАВИСНИ ПУТ АПОПТОЗЕ

Губитак митохондријалног мембранског потенцијала условљава условљава повећану пермеабилност митохондријалне мембране и као резултат може доћи до ослобађања протеина као што су *AIF* (енг. *apoptosis-inducing factor*) и *Endo-G* (енг. *Endonuclease G*). Ова два протеина могу активирати митохондријални каспаза независни пут апоптозе. Као одговор на апоптотоски сигнал *AIF* напушта митохондрије и одлази у једру при чему узрокује кондензацију ДНК молекула и кондензацију хорматина. Протеин *Endo-G* је од значаја за митохондријалну ДНК репликацију. Након изласка из митохондрија *Endo-G* одлази у једру где индукује фрагментацију ДНК молекула (88, 89).

НЕКРОПТОЗА

Некроптоза представља посебан облик програмиране ћелијске смрти који је генски контролисан. Карактерише се инфламацијом, митохондријалном дисфункцијом, повећаном пропустљивошћу плазма мембране. Такође, цитоплазматске компоненте се ослобађају у екстрацелуларни простор што условљава инфламаторну реакцију у самом ткиву. Есенцијалну улогу у активацији некроптоза имају реактивне кисеоничне врсте, при чему долази до повећане продукције *ROS-a* у митохондријама. Повећана продукција *ROS-a* условљава оштећење ћелијских протеина и мембране. За разлику од апоптозе, некроптозу не карактерише фрагментација ДНК молекула (90).

Некроптоза се може јавити у различитим патолошким стањима где постоји ћелијско оштећење или стрес. Овај облик програмиране ћелијске смрти се може јавити код ретиналне исхемијске-реперфузије, акутног панкреатитиса, Хантингтонове болести (91, 92, 93).

АНТИКАНЦЕРСКИ ЛЕКОВИ

Подела антиканцерских лекова обухвата сам механизам деловања (антипролиферативне активности).

Алкилирајући агенси имају способност ковалентног везивања са ћелијским компонентама. Већина лекова који садају у ову групу могу се везати за *N7* гванин ДНК ланца. Као резултат овог везивања ремете се процеси транскрипције и репликације, долази до оштећења ДНК молекула и иницира се апоптоза. Имајући у виду да је примарна „мета“ ових лекова молекула ДНК, алкилирајући агенси имају релативну селективност. Прецизније, највећи антипролиферативни ефекат ова група лекова остварује на ћелије које се брзо деле. Сви алкилирајући агенси могу условити мијелосупресију, повећан ризик од настанка леукемије и другог типова малигнитета. У ову групу лекова убрајамо цисплатину (94).

Антиметаболити могу условити инхибицију метаболичких путева који су укључени у синтезу ДНК молекула. Такође, могу да се укључе у синтезу ДНК или РНК уместо природних нуклеотидних база. У ову групу лекова спада метотрексат, који инхибира ензимску активност дихидрофолат редуктазе. Овај ензим је кључан у синтези тимидина, па сама инхибиција доводи до спречавање синтезе ДНК. Метотрексат примењујемо најчешће орално (такође даје се интравенски), лек има малу липосолубилност (у мањем проценту пролази крвно-моздану баријеру). Ово има клинички значај јер метотрексат не можемо ефикасно да примењујемо у терапији малигнитета ЦНС-а. Други хемотерапеутици који спада у ову групу лекова је 5-

Флуороурацил који је заправо аналог пиримидина. Прецизније може да се угради у РНК и да тиме услови и инхибицију синтезе ДНК (94, 95).

Цитотоксични антибиотици представљају посебну групу хемиотерапеутика и свој антитуморски ефекат остварују делујући директно на ДНК малигно трансформисане ћелије. Доксорубицин спада у ову групу лекова и свој антитуморски ефекат остварује интеркалацијом између одговарајућих парова база ДНК ланца. Ово условљава инхибицију репликације и транскрипције, при чему је онемогућена ћелијска деоба. Овај лек свој антипролиферативни ефекат може остварити и као инхибитор ензима топоизомеразе II. Овај ензим је од есенцијалног значаја одмотавање и премотавање ДНК ланца у току одвијања процеса репликације и транскрипције. Доксорубицин може условити појачано стварање реактивних кисеоничних врста у свим ћелијама, при чему појачано генерисање ROS-а може бити главни узрок најозбиљнијег нежељеног ефекта кардиотоксичности (94, 95).

Деривати биљака чине разноврсну групу цитостатика, а свој антипролиферативни механизам заснивају на ометању ћелијске деобе (митозе). Најважнији винка алкалоиди су винкрестин, винбластин и виндезин. Ови лекови свој антиканцерски ефекат испољавају везивањем за тубулин (градивна компонента микротубула). Овим механизмом спречавамо формирање микротубула односно саму полимеризацију тубулина. Прецизније инхибира се формирање митотског вретена који је неопходан у раздвајању хромозома током митозе. Све ово за последицу има активацију апоптозе (94).

У циљу ефикасне терапије одређених типова малигнитета хормонска терапија има есенцијалну улогу. Ови лекови могу инхибирати или изменити деловање хормона (који подстичу туморски раст). Овакав вид терапије је од великог значаја код карцинома дојке и простате. У ову групу лекова спадају антагонисти хормонских рецептора, пример је тамоксифен. У ткиву дојке тамоксифен инхибира деловање естрогена, делује као селективни модулатор естрогенских рецептора (*SERM*) (94).

Резистенција на лек која се развија код малигно измењених ћелија може бити примарна (приликом давања прве дозе лека) или стечена (развија се након дуготрајне примене лека). Стечен облик резистенције на лек је условљен адаптацијом ћелије на лек (94, 95).

Примери механизма резистенције обухватају смањено накупљање лека у ћелијама као последица повећане експресије протеина за транспорт лекова, недовољна активација лека, повишена инактивација, повећано коришћење алтернативних метаболичких путева, промена активности циљног ензима итд.

КОМПЛЕКСИ МЕТАЛА

Есенцијалну улогу у биохемији и хемији имају једињења (комплекси) прелазних метала. Предности оваквих структурних комплекса су висока редокс активност, могућност координације са различитим врстама лиганата као и висока реактивност према органским супстратима. Синтеза једињења метала са различитим лигандима нам омогућава одржавање стабилности синтетисаног комплекса, висок степен растворљивости и дистрибуције у циљане ћелије (малигне ћелије). На основу претходно наведених чињеница, можемо закључити да овако синтетисани потенцијални хемиотерапеутици могу у будуности имати већи степен селективности према канцерским ћелијама и тиме потенцијално смањити број нежељених ефеката (96).

Једињења метала као што је на пример цисплатина, оксалиплатина, карбоплатина имају есенцијални терпијски потенцијал када говоримо о различитим малигнитетима. Такође, једињења прелазних метала показују снажна антимикуробна својста. Цисплатина као главни представник комплекса метала иако се веома успешно клинички примењује, након дуготрајне примене може дати велики број нежељених ефеката (94, 95). Такође, треба напоменути да посебан проблем може представљати развој резистенције на сам лек. Стога, новија истраживања се базирају на синтези нових једињења (потенцијалних цитостатика), односно комплекса који осим платине могу у својој структури имати и друге метале (рутенијум, паладијум, злато, бакар итд.).

У многим истраживањима као потенцијални хемиотерапеутици који ће превазићи недостатке цисплатине помињу се $Ru(II)$ и $Ru(III)$, комплекси. У процесу канцерогенезе веома је битно повећано допремање гвожђа, стога ћелије повећано експримирају рецептор за трансферин. Веома је битна чињеница да $Ru(III)$ има могућност да се веже за трансферин (опонаша метаболизам Fe^{3+}) и тако да се омогући ефективно допремање до канцерских ћелија. Осим трансферински посредоване ендокитозе, улазак једињења рутенијума је могућ и пасивном дифузијом, посебно када се ради о липосолубилним ароматичним лигандима (97, 98).

Рутенијум је заступљен у оксидационим стањима II , III , IV , VI и $VIII$ (99). Након уласка у туморске ћелије комплекси рутенијума имају различите „таргет“ молекуле што условљава и различите механизме антипролиферативне активности. Када говоримо о самом метаболизму унутар канцерске ћелије најчешће се $Ru(III)$ конвертује у $Ru(II)$. Овако настала $Ru(II)$ једињења могу инхибирати ензимску активност топоизомеразе II (регулаторни ензим у репликацији ДНК молекула) и самим тим индуковати апоптозу малигне ћелије (98, 99, 100, 101). Следећи цитотоксични механизам једињења рутенијума се заснива на инхибицији ћелијске деобе, а то је омогућено ирверзибилним везивањем комплекса за ДНК канцерске ћелије (98). Осим тога, антипролиферативни механизам подразумева акумулацију комплекса рутенијума у митохондријама што условљава смањење мембранском митохондријалног потенцијала и активацију апоптозе (98). Прецизније чим садржај из оштећених митохондрија пређе у цитосол активира се каскадна реакција унутрашњег митохондријалног пута. Осим митохондрија, једињења рутенијума индукују оштећење ендоплазматског ретикулума при чему долази до појаве оксидативног стреса који ће условити појачану продукцију реактивних кисеоничних врста и апоптозу (102). Једињења рутенијума могу оштетити и лизозоме при чему се ослобађају лизозомални ензими и индукује оштећење ћелије и апоптоза (103).

Осим комплекса рутенијума, једињења злата такође демонстрирају веома снажан антитуморски ефекат на различите ћелије у *in vitro* условима. Бројне студије су доказале да се $Au(I)$ једињења могу везати за тиол групе које улазе у састав активног каталитичког центра многих ензима, чија је активност од есенцијалног значаја за функционисање ћелија. Пример једног оваквог ензима је тиоредоксин редуктаза ($TrxR$) чија је есенцијална улога у одржавању редокс потенцијала у ћелијама. Активност овог ензима се инхибира једињењима злата што даље условљава повећану концентрацију реактивних кисеоничних врста у ћелији. Прецизније долази до индукције оксидативног стреса, оштећења ћелијских структура и активације апоптозе (104, 105).

Као и *Au (I)* једињења, тако и комплекси *Au (III)* поседују цитотоксично и антимастистатско дејство у *in vitro* условима. Свој антитуморски ефекат комплекси *Au (III)* могу да индукују инхибицијом ензимске активности *TrxR*. Осим тога једињења *Au (III)* могу активирати унутрашњи митохондријални пут, тако што изазивају оштећење митохондрија и излазак садржаја у цитосол ћелије. Осим тога, комплекси злата се могу везати и за ДНК молекулу туморске ћелије и тиме активирати апоптозу. (106). Даље, везивањем за молекулу ДНК једињења *Au (III)* заустављају ћелијски циклус у S фази и спречавају убрзану малигну пролиферацију (107).

Паладијум као прелазни метал има могућност везивања за различите лиганде и оксидациона стања су +2 и +4. У бројним научним публикацијама можемо видети да је синтетисан велики број једињења паладијума која су показала снажан антипролиферативан ефекат према малигно трансформисаним ћелијама у *in vitro* условима (108, 109, 110). Осим тога једињења паладијума демонстрирају и снажан антимикуробни ефекат. Свој антитуморски ефекат *Pd(II)* једињења остварују активацијом апоптозе (активација каспазе-3), повећањем продукције реактивних кисеоничних врста у малигној ћелији (смањењем *GSH*) (108, 111). Даље, ова једињења могу нарушити мембрански потенцијал митохондријалне мембране при чему се унутар саме ћелије повећава концентрација проапоптотичних протеина (108, 109). Комплекси *Pd(II)* могу индуковати застој ћелијског циклуса у различитим фазама (најчешће *G2/M*) (111). Студије су такође показале да паладијум једињења могу инхибирати ензиме који су повезани са антиоксидативном заштитом што ће условити повећану продукцију реактивних кисеоничних врста (111, 112). У појединим студијама можемо на основу доступних података закључити да паладијум комплекси у *in vitro* условима показују висок степен селективности у односу на цисплатину. Висок степен селективности подразумева да се снажан антипролиферативни ефекат испољи на малигно трансформисаним ћелијама, док се знатно слабији или умеренији цитотоксични ефекат демонстрира на малигно неизмењеним ћелијама (108).

Једињења сребра, *Ag(I)* комплекси демонстрирају снажну *in vitro* антипролиферативну активност према канцерским ћелијама (113, 114). Своје антипролиферативно дејство ова једињења остварују захваљујући интеракцији са ДНК молекулом и везивању за тиол активне групе ензима. Јасно је да комплекси сребра кроз овакав механизам индукују апоптозу, митохондријалним путем. Прецизније, доводе до повећане продукције реактивних кисеоничних врста, повећане концентрације проапоптотских протеина и поремећаја у мембранском потенцијалу митохондрија (115). Такође, комплекси сребра су у *in vitro* условима показали већи степен селективности, односно мањи антипролиферативни ефекат према малигно нетрансформисаним ћелијама (116).

БАКАР

Олигоелементи (елементи у траговима) су од есенцијалног значаја за развој, диференцијацију ткива и физиолошко одвијање метаболизма. За физиолошко одвијање метаболизма неопходно је присуство тринаест олигоелемената, а то су гвожђе, бакар, цинк, хром, манган, флуор, јод, молибден, стронцијум, кобалт, селен, никл и вандалијум (117).

Укупна количина бакра у нашем организму износи 100-150 mg, при чему највећи део је локализован у јетри, мозгу, бубрезима и срцу. Нормална концентрација у серуму бакра је 10-24 $\mu\text{mol/l}$. Реапсорпција бакра се овија у горњим деловима танког црева, а након апсорпције бакар се везује за албумине крвне плазме и сав апсорбовани бакар одлази у јетру (117, 118). За апсорпцију бакра неопходна је кисела средина, већа количина бакра у самом цревном садржају и мања количина калцијума. Апсорпцију бакра спречава већа количина калцијума и других метала са којима бакар ствара нерастворне соли, сулфиде. У јетри метаболизам бакра се одвија на два веома значајна начина. Одређени проценат бакра се излучује из жучи у танко црево, при чему се овај део бакра не може поново апсорбовати. Претходно описаним механизмом уједно елиминишемо вишак бакра из организма. Други метаболички пут обухвата уграђивање бакра у апоцерулоплазмин који спада у групу α 2-гликопротеина (117). Везивањем бакра за апоцерулоплазмин долази до формирања церулоплазмине. Овако створен церулоплазмин се из јетре ослобађа у циркулацију (117, 118). Веома је битна чињеница да око 95% бакра у серуму се налази у право у склопу церулоплазмине. Око шест до осам атома бакра се може везати за церулоплазмин у купро (Cu^+) и купри облику (Cu^{2+}). Осим за церулоплазмин бакар је везан и за албумине и аминокиселине али у знатно мањем проценту (5%). Имајући у виду чињеницу да је бакар у највећем проценту везан за протеине његова елиминација урином је минимална (117, 118, 119).

Физиолошка улога бакра се састоји у томе што је метал интегрална компонентна различитих врста металоезима. Прецизније, за саму каталитичку активност ензима неопходно је присуство бакра. Металоензими који садрже бакар као структурну компонентну су: цитохром оксидаза, супероксид дизмутаза, тирозиназа итд. Цитохром ц оксидаза је кључна у процесу оксидативне фосфорилације и добијање неопходне енергије, док ензим супероксид дизмутаза има есенцијалну улогу у заштити од штетних ефеката реактивних кисеоничних врста. Супероксид дизмутаза катализује реакцију дизмутације супероксидног радикала у водоник пероксид. Бакар у овој реакцији директно утиче на транспорт електрона што иде у прилог томе да је есенцијална компонента за ензимску активност овог металоензима (117, 118).

Раст концентрације бакра у серуму је могућ у току инфекција или инфламаторног стреса. Разлог повећања концентрације овог метала лежи у појачаној синтези апоцерулоплазмине који спада у групу протеина акутне фазе. Многе акутне и хроничне болести прати повећање концентрације бакра у серуму нпр. реуматски артритис, гломерулонефритис, малигни тумори итд. Са друге стране физиолошко повећање концентрације бакра налазимо код трудница, где је концентрација овог елемента повећана два до три пута у односу на физиолошке вредности. Уколико дође до смањења концентрација бакра у серму трудница ово може бити индикатор претећег абортуса. На концентрацију бакра утиче и естроген, стога је концентрација бакра у

серуму жена већа у поређењу са концензацијом бакра у серуму мушкараца (117, 118, 119).

Код превремено ређене деце дефицит бакра је чест. Симптоми дефицита бакра у почетној фази су neuropатија, хипохромна анемија, остеопороза смањена пигментација коже, бледило и неуролошки поремећаји. Сви наведени поремећаји су заправо последица смањене активности цитохром оксидазе и супероксид дизмутазе (118, 119).

Одређивање бакра у серуму је од есенцијалног значаја за дијагностиковање *Wilsonove* болести. Болест се наслеђује аутозомно доминантно и настаје због поремећаја у синтези протеина АТР7В. Ген је лоциран на хромозому 13q14,3-q21,1. Саму болест карактерише смањена екскреција бакра путем жучи и смањено везивање бакра за апоцерулоплазмин. Пацијенти имају веома ниске вредности церулоплазмине у крви, услед тога највећи део бакра је слабо везан албумине што омогућава таложење бакра у ткивима као што су јетра, базалне ганглије мозга и корнеа ока. Оштећења ових ткива су последица присуства слободног бакра који се у невезаној форми укључује у процес липидне пероксидације, а као последица тога настаје хиперпродукција хидроксилног радикала. Хидроксилни радикал као најреактивнија врста има могућност да оштети и наруши интегритет сваке ћелијске структуре. Такође, долази до повећане екскреције бакра преко бубрега. Дефинитивна дијагноза се поставља биопсијом јетре и повећаним вредностима бакра у урину (117, 118).

КОМПЛЕКСИ БАКРА

Једињења бакра су се показала као веома ефикасни потенцијални хемиотерапеутици у *in vitro* условима (120, 121). Једињења *Cu(II)* могу ихибирати активност ензима Топоизомеразе I и топоизомеразе II чиме се онемогућава одвијање процеса транскрипције и транслације код канцерских ћелија (122). Услед могућности промене валентног стања између *Cu(II)/Cu(I)* могућа је индукција оксидативног стреса (повећава се концентрација реактивних кисеоничних врста), јавља се оштећење митохондријалне мембране при чему долази до апоптозе канцерске ћелије. Осим тога комплекси бакра индукују застој ћелијске деобе у S фази ћелијског циклуса (123) Једињења бакра могу смањити концентрацију антиапоптотског *Bcl-2* протеина и повећати концентрацију проапоптотског *Bax* протеина што ће условити програмирану ћелијску смрт (124). Како приликом апликовања комплекса бакра у *in vitro* условима долази до оштећења митохондрија, цитохорм ц се ослобађа у цитоплазму што активира унутрашњи митохондријални пут.

Свој снажни антипролиферативни ефекат комплекси бакра са различитим лигандима су демонстрирали на различитим ћелијским линијама у *in vitro* условима *VxPC-3* (карцином панкреаса), *A549* (аденокарцинома плућа), *HeLa* (канцер цервикса), *Hep-G2* (хепатоцелуларни карцином) итд (125,126). Свој антитуморски ефекат је остварен индукцијом апоптозе или заустваљањем ћелијског циклуса. Такође, комплекси бакра су демонстрирали снажнији антипролиферативни ефекат у *in vitro* условима од цисплатине (127)

ЦИСПЛАТИНА

Хемиотерапеутик цисплатину је открио научник *Barnetta Rosenberg* 1965. године (128). Након овог открића, почела су интензивна истраживања у пољу антитуморске активности цисплатине, при чему се овај лек показао као снажан потенцијални хемиотерапеутик. Даље, 1978. године овај лек је одобрен званично за клиничку употребу. Цисплатина припада групи алкирирајућих агенаса (цитостатика). Основни ефекат алкирирајућих агенаса и саме цисплатине се заснива на формирању хемијски чврстих, ковалентних веза са ћелијским компонентима. Прецизније, унутар саме ћелије цисплатина се чврстим везама везује за молекуле ДНК малигно трансформисане ћелије, у највећем броју случајева за N7 гванина. Овакав начин могућности везивања цисплатине доводи до формирања „*cross-links*“ укрштених веза и прекида у континуитету самог ДНК ланца ћелије. Формирањем „*cross-links*“ веза иницира се процес програмиране ћелијске смрти, такође долази и до застоја у активном одвијању ћелијског циклуса малигне ћелије. Можемо закључити да ефекти цисплатине подразумевају инхибицију процеса репликације и транскрипције (94, 95).

Структурно посматрано цисплатина је хидросолубилни молекул где центар молекула заузима платина окружена са два атома хлора и две амонијум групе (129). Овај хемиотерапеутик се примењује спором интравенском инфузијом при чему треба нагласити да може озбиљно угрозити бубрежну функцију ако се не обезбеди адекватна хидратација и диуреза. Након уласка у циркулацију око 90% овог цитостатика се везује за протеине плазме (албумин, глутатион и трансферин). Преостала слободна, невезана фракција улази у ћелије и везује се ковалентно за ДНК молекуле при чему се индукује апоптотоски процес (94, 95).

Улазак цисплатине у малигни ћелију је омогућен проласком директно кроз липосолубилну плазма мембрану која окружује цитоплазму, процесом који називамо пасивна дифузија. Осим пасивне дифузије, у дистрибуцији цисплатине учествује и активни транспорт. Прецизније, активни транспорт овог цитостатика се спроводи у присуству специфичних протеинских транспортера *CTR1* (енг. *Copper Transporter 1*) и *OCT2* (енг. *Organic Cation Transporter 2*) (130, 131). Први поменути протеински транспортер *CTR1* је од есенцијалне важности за улазак бакра, али кроз овај транспортер може ући и цисплатина. Са друге стране, *OCT2* протеински носач је локализован у бубрезима, при чему цисплатина уласком у тубулоците кроз овај транспортер може довести до некрозе тубула (нефротоксичности) (132).

Након уласка у саму ћелију долази до хемијске промене цисплатине, прецизније формирања њене активне форме. Хлоридни лиганди се замењују молекулима воде, при чему овако настали активни комплекс је високо реактиван и везује се за ДНК молекуле иницирајући унутрашњи апоптозоки пут. Формирање активног комплекса цисплатине унутар ћелије омогућава и снижена вредност хлорида у самом цитосолу у односу на концентрацију у серуму (94, 95).

Након дуготрајне примене цисплатине може се јавити резистентност код малигно трансформисаних ћелија. Сам механизам развоја резистенције на лек је веома сложен и мултифакторијалан (95). Канцерске ћелије могу временом смањити број транспортера *CTR1* при чему ће се смањити дистрибуција овог хемиотерапеутика. Даље, временом може доћи до повећаног елиминисања цисплатине из саме ћелије кроз посебне пумпе *ATP7A* и *ATP7B*. Есенцијална улога ових *ATP7A* и *ATP7B* транспортера

је регулација концентрације бакра у ћелијама, при чему за активност ових пумпи је неопходна енергија (АТФ). Ови транспортни системи осим бакра могу да из ћелије „елиминишу“ и цисплатину чиме смањују концентрацију овог лека унутар малигних ћелија (133). Још механизам развоја резистенције туморских ћелија на цисплатину подразумева повећану синтезу глутатиона. Глутатион је по својој хемијској структури трипептид у чији састав улазе три аминокиселине глутамат (глутаминска киселина), цистеин, глицин које су повезане ковалентним пептидним везама. Глутатион преко свој -SH (тиол) групе може везати цисплатину и формирати неактиван комплекс (*Pt-GSH*), који се не може везати за молекулу ДНК. Новоформирани неактиван комплекс *Pt-GSH* се може елиминисати путем *ATP7A* и *ATP7B* транспортера (134, 135).

Осим појаве резистенције канцерских ћелија на цисплатину, применом овог лека долази до великог броја нежељених дејстава услед слабе селективности. Главна нежељена дејства обухватају нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, кардиотоксичност, мијелосупресију, мучнину, повраћање итд (94, 95, 136).

Нефротоксичност је индукована нагомилавањем цисплатине у тубулоцитима посредством *OCT2* протеинског носача (137). Мијелосупресија је условљена самим дејством цисплатине на ћелије које се брзо деле (ћелије коштане сржи). Хепатотоксичност и гастроинтестинална токсичност су последица везивања лека неселективно за различите ћелијске компонентне при чему долази до оштећења ткива. Прецизније, већина нежељених ефеката када говоримо о цисплатини је последица повећане продукције реактивних кисеоничних врста и оштећења митохондрија. Дакле, присуство цисплатине индукује појаву оксидативног стреса (94, 95).

КОЛОРЕКТАЛНИ КАРЦИНОМ

Колоректални карцином је други по реду. Иза малигнитета плућа узрок смрти и Сједињеним Америчким Државама. Само у 2020. години дијагностиковано је 1 900 000 нових случајева колоректалног карцинома широм света . Исте године забележено је око 930 000 смртних случајева узрокованих овим малигнитетом. У временском оквиру од 1999. године до 2020. године у Србији је од колоректалног малигнитета оболело 1696 мушкараца и 1112 жена. Просечна стопа инциденције је била 34,4 за мушкарце и 19,5 за жене . У свету стопа инциденције је протеклих 25 година опала, а разлог лежи у самом редовном вршењу скрининга. Прецизније, стопа морталитета у Сједињеним Америчким Државама је опала за око 25% као полсецица ране дијагностике овог малигнитета (138, 139).

Сматра се да сам настанак колоректалног малигнитета је повезан са исхраном богатом црвеним и прерађеним месом. Прецизније, животињске масти које су локализоване у црвеном месу условљавају повећање пропорције анаероба у микрофлори црева, што за последицу има конверзију нормалних жучних киселина у канцерогене. Осим тога постоји постоји позитивна корелација између повишених вредности холестерола и ризика за настанак колоректалног карцинома. Абдоминална гојазност, физичка неактивност, пушење, старост и алкохол су такође фактори ризика за настанак канцера. Развој инсулинске резистенције такође повећава ризик од обољевања (140, 141).

Треба истаћи да процентуално гледано колоректални рак највише се развија из аденоматозних полипа. У самим полипима (као и колоректалном раку) детектоване су разне молекуларне промене које услед дуготрајног времена доводе до развоја инвазивног карцинома. Овај процес канцерогенезе обухвата тачкасте мутације у *K-ras* протоонкоген, хипометилацију ДНК, губитак алела на дугом краку хрозома 5 (5q21), губитак алела на месту тумор супресорског гена лоциран на хромозому 18q итд (140, 142).

Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома обухватају и хередитарне синдроме у шта убрајамо Линчов синдром, МҮН полипоза, Фамилијарна аденоматозна полипоза. Можемо закључити да је од есенцијалног значаја сама генетика у развоју канцерогенезе колона (140).

Јасно је да ће симптоми колоректалног карцинома варирати у складу са самом анатомском локализацијом малигнитета. Врло често у почетној фази развоја канцера симптоми су неспецифични и одсутни. Малигнитет који је настао у цекуму и у асцедентном колону може се проширити без опструктивних симптома. Доминантно је да пацијенти који имају развијен канцер у асцедентном колону често имају умор, палпитације и присутну хипохромну микроцитну анемију. Анемија је условљена крварењем (140).

Код тумора у десцедентном колону постоји опструкција проласка столице, што условљава појаву абдоминалних грчева. Малигнитет у ректосигноидном делу дебелог црева прати присуство свеже крви у столици (хематохезија), тенезми као и промене у навикама пражњења (140).

Оптималан третман колоректалног рака подразумева хирушко лечење, тоталну ресекцију тумора. Хирушко лечење је од есенцијалног значаја у раном стадијуму болести. Насупрот томе, у адјувантној и метастатској фази болести користимо од

хемиотерапеутика 5-Флуороурацил (5-FU) који примењујемо интравенски и примена овог лека је од есенцијалног значаја код пацијената са метастатским променама у јетри. Одличан ефекат овај хемиотерапеутик има у комбинацији са комбинацији са леуковорином (фолинатом), поготово код узнапредовалог стадијума болести. Такође, у терапији колоректалног карцинома се примењује оксалиплатин као комбинација 5-FU и леуковорин са оксалиплатином (140, 143).

МАЛИГНИТЕТ ЦЕРВИКСА

Малигниет грлића материце је четврти по учесталости карцином код жена широм света (144). У 2020. години је дијагностиковано 604 127 нових случајева са инциденцијом од 13,3 на 100 000 жена (145). Такође је важно нагласити да највећи број новодијагностикованих жена живе у земљама ниског индекса развоја. У Србији је 2002. године инциденција обољевања од карцинома грлића материце износила око 27,2 на 100 000 жена (146). За 2020. годину, процењена инциденција у Србији била је 18,7 на 100 000 жена (144). Само у 2022. години је процењено око 348 709 смртних случајева од рака грлића материце (147).

Главни узрок развија цервикалног карцинома представља инфекција *HPV* (енг. *Human Papilloma Virus*). Сматра се да је ово заправо примарни догађај у развоју канцерогенезе. Овај вирус је изграђен од дволанчане ДНК (*dsDNA*) и припада породици *Papillomaviridae*. Даље, *HPV* има могућност да инфицира епител у региону трансформационе зоне цервикса. Детектовано је до сада више од 60 типова *HPV* вируса, при чему 20 има способност да индукује развој канцерогенезе што ће даље условити развој инвазивног карцинома. Карактеристично је да су типови *HPV-16* и *HPV-18* залужни за развој дисплазије високог градуса. Осим *HPV* инфекције у факторе ризика тза настанак канцера цервикса убрајамо рано ступање у сексуалне односе, велики број сексуалних партнера, пушење и имуносупресија (140).

HPV геном кодира протеине *E6* и *E7* који имају могућност да се везују и инхибирају активност p53 протеина. Овај протеин p53 је заправо чувар генома и има есенцијалну улогу у нормалном функционисању ћелије. Осим тога *E7* протеин се може иреверзибилно везати и спречити нормалну функцију *pRb* (енг. *retinoblastoma protein*). Овај молекул *pRb* је од есенцијалног значаја за контролу одвијања ћелијског циклуса (148).

Рана фаза болести је најчешће асимптоматска, док се код развијеног инвазивног карцинома јавља посткоитално крварење, крварење између циклуса или менометрорагија. Осим тога јавља се непрјатан мириси и жућкасти исцедак. Метастатску газу болести карактерише бол у леђима или карлици, оток ногу (компресија лимфних судова), тромбоза дубоких вена (140).

Дијагноза канцера цервикса се поставља на основу анамнестичких података, гинеколошког прегледа (видљив тумор на грлићу материце, улцерације), Папаниколау теста (скрининг метода за ране промене на грлићу), *HPV* тест, биопсија. Есенцијална улога Папа теста је да се открије асимптоматска преинвазивна дисплазија ћелија грлића материце (140).

Важно је истаћи да постоје одобрене вакцине које садрже рекомбинантне протеине вируса *HPV-16* и *HPV-18* за које се сматра да су одговорни за преко 60% случајева појаве канцера. Само вакцинисање жена пре него што постану сексуално активне (пре излагања вирусу) смањује стопу инфекције и спречавају појаву

дисплазије. Треба напоменути да су и вакцинисане жене и даље изложене ризику од других врста *HPV* инфекције па је и даље неопходно применити Папа тест (140).

Сам терапијски приступ када је у питању карцином цервикса зависи од степена захваћености ткива, величине тумора и метастатских промена. Рана локализована болест се може решити хирушким путем и радиотерапијом. Код метастатске фазе болести могу се применити хемиотерапеутици цисплатин и карбоплатин (140).

МУЛТИФОРМНИ ГЛИОБЛАСТОМ АСТРОЦИТОМИ ГРАДУСА IV

Астроцитоми представљају инфилтративне туморе који настају и развијају се од глијалних ћелија. Светска здравствена организација (енг. *WHO, World Health Organization*) према хистолошким параметрима класификује астроцитоме на четири прогностичка градуса. Грaдус I (пилоцитни астроцитом, субependимални астроцитом гигантских ћелија), грaдус II (дифузни астроцитом), грaдус III (анапластични астроцитом) и грaдус IV (глиобластом) (140).

Већина високоградусних астроцитом су заправо глиобластоми. Мултиформни глиобластом представља најчешћи и најагресивнији примарни тумор централног нервног система са просечним преживљавањем од момента постављања дијагнозе 15 месеци. Инциденција износи просечно 3,19 случајева на 100 000 особа годишње у Сједињеним Америчким Државама. У тренутку постављања дефинитивне дијагнозе просечна старост пацијената је 64 године. Иако је појава овог малигнитета чешћа код старијих особа, могућа је појава и код млађих особа (до 19 година), али чини удео од само 3% свих врста дијагностикованих малигнитета мозга код младих. Можемо јасно закључити да је глиобластом тумор одраслих, док су код деце су други типови малигнитета централног нервног система чешћа појава. (140, 149).

У факторе ризика за настанак мултиформног глиобластома спада изложеност високим дозама јонизујућег зрачења (150). Такође, имуносупресија значајно је повезана са појавом глиобластома. Насупрот томе, студије су показале да постојање алергијских или атопијских болести је повезано са смањеним ризиком од развоја овог малигнитета. (151). У настанку глиобластома као што је случај и са другим врстама малигнитета долази до генских поремећаја који условљају развој канцерогенезе. Ген *EGFR* (енг. *Epidermal Growth Factor Receptor*) је од есенцијалног значаја за регулацију ћелијске деобе и саму прогресију ћелије. Прецизније, активацијом овог гена кодира се рецептор који је локализован на плазма мембрани ћелије (тирозин киназни рецептор), при чему након везивања одговарајућег лиганда долази до активације сигналних путева који промовишу ћелијску деобу и спречавају индукцију апоптозе. Стога, јасно је да појачана експресија или мутација у гену *EGFR* доприноси развоју канцера (152). Даље, у развоју малигнитета улогу има и губитак функције или делеција гена *PTEN* (енг. *Phosphatase and Tensin Homolog*). Овај ген има улогу у инхибицији неконтролисаних ћелијске деобе стога губитак резултира повећану пролиферацију малигних ћелија (153). Ген *TERT* (енг. *Telomerase Reverse Transcriptase*) је од есенцијалног значаја у контроли дужина теломере. Мутације овог гена су повезане са избегавањем процеса апоптозе чиме ћелије могу неконтролисано да се деле (153). Осим тога, улогу у развоју канцерогенезе мултиформног глиобластома има инактивација или делеција гена *CDKN2A/CDKN2B*. Ови гени спадају у тумор супресорске гене чија је есенцијална улога у стогој контроли ћелијске деобе (152). Мутације гена *IDH1* и *IDH2* (енг.

Isocitrate Dehydrogenase 1, Isocitrate Dehydrogenase 2) су присутне код мултиформног глиобластома, при чему се ове мутације најчешће јављају код млађих пацијената. Физиолошка улога ових гена је у синтези регулаторних ензима који учествују Кребсовом циклусу. У физиолошким условима циклус лимунске киселине је важан за добијање енергије (153). Ген T53 спада у групу тумор супресорских гена, физиолошка улога је у контроли одвијања ћелијског циклуса, активацији програмиране ћелијске смрти и поравке ДНК молекула. Мутације овог гена доводе до инхибиције спољашњег и унутрашњег апоптотоског пута као и промоције канцерогенезе (154). Астроцитоми градуса IV су високоинфилтративни тумори, а области појачаног *T2/FLAIR* сигнала који окружује главну туморску масу садрже инвазивне туморске ћелије.

Када говоримо о клиничкој слици пацијената оболелих од мултиформног глиобластома, она се не разликује у значајној мери од присутних симптома код других обољења централног нервног система. Главобоља је често присутна у јутарњим (може пацијента пробудити из сна) часовима може бити праћена мучнином и повраћањем. Такође, могу се јавити епилептични напади, фокални неуролошки дефицити, поремећај стања свести и поремећај вида (140, 155). Према доступним подацима Glioma Outcomes Projectu око 60% пацијената наводи као водећи симптом главобољу (156). Често се у склопу болести јавља поремећај личности и понашања. Јавља се апатија, недостатак мотивације, заборавност, смањена или повећана раздражљивост. Осим тога, јавља се депресија или анксиозност, губитак интересовања за раније активности и немогућност да се изврше започети задаци (157).

Сви претходно описани симптоми у пракси се врло често мешају са психијатријским поремећајима, што може за последицу имати одлагање дијагнозе. Из свега претходно наведеног можемо закључити да се ради о веома агресивном тумору где је рана дијагноза од есенцијалног значаја.

Стандарна терапија мултиформног глиобластома подразумева хирушку интервенцију, радиотерапију и хемиотерапију. Од цитостатика користи се темозоломид, хемиотерапеутик који спада у групу алкилирајућих агенаса и примењује се орално. Нежељена дејства овог лека су последица неселективности, па се може јавити супресија коштане сржи, кардиотоксичност, хепатотоксичност, нефротоксичност (158).

Новије терапијске мере које су још у фази испитивања подразумевају таргетиране молекуларне агенсе усмерене ка тирозин киназним рецепторима и рецепторима *VEGFR* (159).

Прогностички фактори зависе од туморског градуса, животне доби хистолошких одлика као и анатомске локализације. Посебан проблем у лечењу представља појава резистенције канцерских ћелија на темозоломид.

Из претходно наведених чињеица, можемо закључити да би развитак потенцијалних цитостатика могао да помогне у ефикаснијој терапији мултиформног глиобластома.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

Циљ овог истраживања јесте испитивање антитуморског дејства новосинтетисаних бакар(II) једињења на туморске ћелијске линије *U251*, *HeLa* и *HCT116*, као и на малиго неизмењене фибробласте *MRC-5*. Након процене цитотоксичног дејства, детаљно ће се анализирати молекуларни механизми који доводе до антипролиферативног ефекта.

У складу са постављеним циљем поставили смо следеће експерименталне циљеве:

1. Анализирати антитуморски ефекат новосинтетисаних бакар(II) једињења на изабране канцерске и немалигне ћелије.
2. Идентификовати механизам који условљава статистички значајно смањење вијабилности канцерских ћелија и одредити доминантан тип ћелијске смрти услед дејства бакар(II) једињења.
3. Анализирати промене у експресији есенцијалних молекула укључених у регулацију ћелијске пролиферације односно, активност проапоптотског протеина активног-*Bax*, активност антиапоптотског протеина *bcl-2* као и активност каспазе-3.
4. Утврдити утицај новосинтетисаних бакар(II) једињења на одвијање ћелијског циклуса.

Хипотезе студије:

- Новосинтетисани бакар(II) комплекси делују цитотоксично на *U251* (глиобластом), *HeLa* (карцином цервикса), *HCT 116* (карцином колона) туморске ћелије.
- Новосинтетисана бакар(II) једињења демонстрирају минималан или веома слаб антипролиферативни ефекат на контролну ћелијску популацију, фибробласте *MRC5*.
- Антитуморско дејство тестираних једињења остварује се индукцијом програмиране ћелијске смрти.
- Услед индукције процеса апоптозе долази до промене у *Bcl-2/Bax* односу, који фаворизују активацију митохондријалног пута апоптозе.
- Апоптоза туморских ћелија је каспаза зависна, односно долази до повећања удела ћелија које емитују флуоресценцију карактеристичну за активну каспазу-3.
- Новосинтетисани комплекси бакра редукују вијабилност малигних ћелија комбинацијом два механизма, активацијом апоптозе и индукцијом застоја у специфичним фазама ћелијског циклуса.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Наша студија је осмишљена и спроведена као експериментална *in vitro* студија. У истраживању смо користили искључиво хумане ћелијске линије које су комерцијално доступне истраживачкој заједници широм света. У студији су биле укључене следеће ћелијске линије:

- *HCT116*,
- *HeLa*,
- *U251*,
- *MRC-5*.

Ћелијска линија *HCT116* представља хумане ћелије колоректалног карцинома.

Ћелијска линија *HeLa* представља хумане ћелије цервикалног карцинома изоловане из 31-годишње пацијенткиње у болници „*Johns Hopkins*“.

Ћелијска линија *U251* представља хуману ћелијску линију глиобластома/астроцитоме и изолована је из тумора мозга 75-годишњег мушког пацијента. У *in vitro* истраживањима ова ћелијска линија се најчешће користи као модел глиобластома за тестирање антипролиферативне активности разних једињења.

Ћелијска линија *MRC-5* немалигне хумане ембрионалне фибробласте плућа и изолована је из плућног ткива хуманог мушког фетуса старог око 14 недеља. Ова ћелијска линија се најчешће користи у *in vitro* студијама као контролна ћелијска линија.

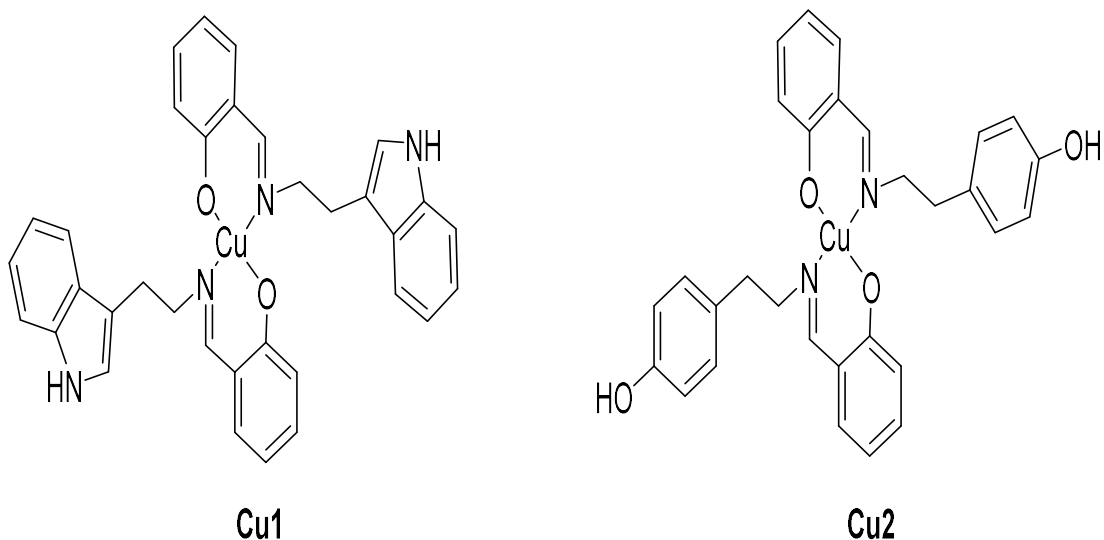
Све тестиране ћелијске културе смо одржавали и култивисали под сличним условима. Суспензија ћелија (коју смо претходно замрзли) одмрзавана је у топлој води максимално два минута уз интензивно мешање. Након одмрзавања, садржај криовајлице смо пребацили у стерилне епрувете у којима је претходно стављено 15 mL комплетног медијума. У следећем кораку епрувете су центрифугиране 10 минута на 1000 обртаја/мин. после чега смо супернатант одвојили, а ћелијски талог је ресуспендован краткотрајним вортексовањем у 5 mL комплетног медијума. Затим смо садржај пребацили у пластичне флашкове који се користе за адхерентне ћелијске културе. Флашкове са ћелијским културама смо поставили у инкубатор са апсолутном влажношћу и 5% CO_2 , при сталној температури од 37 °C.

Све претходно поменуте ћелијске културе смо одржавали у комплетном медијуму за ћелијске културе, које смо припремили у складу са инструкцијама произвођача (*ATCC, American Type Culture Collection*). Затим смо тако припремљен медијум користили за редовну култивацију и одржавање малигних и немалигних адхерентних ћелијских култура.

Ћелијске културе у *in vitro* условима смо култивисали о конfluентности флашка од 90%, након чега смо вршили расејавање ћелија. Све експерименте смо изводили искључиво у експоненцијалној фази раста ћелија, са три узастопна понављања из различитих пасажа. Ово је рађено у циљу обезбеђивања валидних резултата.

Рад са ћелијским културама је извођен у стерилним условима у ламинарној комори са вертикалним протоком ваздуха. Сав материјал је пре и после коришћења прскан 70% медицинским алкохолом (етанол).

Синтеза бакарних једињења извршена је на Природно-математичком факултету у оквиру истраживачке групе под руководством више научне сараднице др Марине Костић.



Слика 3. Структура бакарних једињења

Након јасног дефинисања структуре комплекса бакра, добијени су у количини од по 20 mg. Бакарна једињења су растворљива у диметилсулфоксиду (*DMSO*, *dimethylsulfoxide*), а концентрација *DMSO*-а у радном раствору никада није прелазила 0,05% v/v, што је граница токсичности за ћелије.

Огварајући раствори комплекса бакра су припремани непосредно пре извођења експеримената чиме се обезбедила стабилна структура комплекса. Пре тога је стабилност комплекса након три различита временска интервала од момента растварања у *DMSO*-у потврђена посматрањем и снимањем њихових *UV-Vis* спектра, користећи *Perkin-Elmer Lambda 35* спектрофотометар.

ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА

Независне варијабле (узроци) у нашем истраживању били су примљена једињења бакра док су зависне варијабле (исходи) обухватале резултате стопе преживљавања (вијабилности), цитотоксичности, апоптозе и анализе ћелијског циклуса испитиваних ћелија.

МТТ ТЕСТ

Стопа преживљавања (вијабилност) ћелија као и цитотоксичност новосинтетисаних бакар(II) једињења испитиване су *MTT*-тестом.

MTT тест је изабрана метода за дефинисање стопе преживљавања, односно метаболичке активности ћелија. Прецизније, овим тестом детектујемо активност *NAD(P)H*-зависних оксидоредуктаза, ензима који су функционално присутни искључиво у живим ћелијама. Повишена активност ових оксидоредуктаза у култури указује на већи број метаболички активних, односно виталних ћелија. За правилну интерпретацију резултата овог теста неопходно укључити контролу — популацију ћелија која није изложена ниједном једињењу, већ се одржава у чистом, комплетном медијуму. *NAD(P)H*-зависна оксидоредуктаза је ензим одговоран за редукцију жутог раствора тетразолијум-бромида (5 mg/mL у *PBS*-у) у формаза, нерастворни кристални продукт карактеристичне љубичасте боје. Прецизније, што је интензитет љубичасте боје у узорку након извођења *MTT*-теста већи, то је у том узорку био присутан већи број живих, метаболички активних ћелија. Стога, већа вијабилност указује и на слабији антитуморски ефекат неке испитиване супстанце.

Стопа преживљавања сва четири типа тестираних ћелија (*HCT116*, *HeLa*, *U251*, *MRC-5*) испитана је након 24, 48 и 72 часа инкубације (у три временска интервала) у присуству растућих моларних концентрација једињења бакра ($0,3\text{--}100 \mu\text{M}$). Поред ових једињења, под истим условима тестиран је и утицај цисплатине, која је у нашим експериментима коришћена као позитивна контрола и референтни цитостатик.

Принцип *MTT* теста може се формулисати на следећи начин:

Приближно једнак број ћелија (око 5000 по бунару), након одвајања трипсином из фласкова у којима су биле култивисане, засејаван је у појединачне бунаре 96-бунара микротитар плоча. У тренутку засејавња ћелије су биле у експоненцијалној фази раста, инкубиране су 24 часа на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и $5\% \text{ CO}_2$ како би се залепиле на површини бунара. Након тог периода, ћелије су третиране растућим концентрацијама једињења бакра ($0,3\text{--}100 \mu\text{M}$). Контролу су чинили бунари у које је додат само комплетан медијум (без присуства једињења бакра). Након тога је супернатант аспириран и у бунаре је додат 10% *MTT* раствор, а цитотоксичност је одређивана након 24, 48 и 72 часа. Абсорбанца је читавана на *ELISA* читачу у року од 30 минута, при таласној дужини од 595 nm . Након тога смо рачунали стопу преживљавања ћелија по следећој формули:

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

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

Вредност цитотоксичности смо рачунали по формули:

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

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

Поред наведених варијабли, посебну пажњу смо посветили одређивању IC_{50} вредности (вредност половине максималне инхибиторне моларне концентрације). Вредност IC_{50} је дефинисана применом линеарне или логаритамске регресије, у зависности од типа биолошког одговора на тестирано једињење, уз коришћење програма *Microsoft Excel 2016*, пратећи претходно описану методологију.

ANNEXIN V/PI TEST

Након што смо дефинисали антипролиферативни ефекат једињења паладијума, следећи корак истраживања био је да прецизније испитамо механизам деловања ових једињења. Прецизније, дефинисали смо однос ћелија у апоптози и некрози, користећи *Annexin V/PI* тест и проточну цитометрију за квантитативно мерење ових промена.

Принцип овог теста подразумева у првом кораку третирање ћелија IC_{50} концентрацијом. Апоптотске ћелије карактерише спољашња локализација фосфатидил-серина на ћелијској мембрани, што омогућава везивање молекула *Annexin V*. а детекцију проточном цитометријом, *Annexin V* је коњугован са флуоресцентним *FITC*, који емитује зелену флуоресценцију. Са друге стране, *PI (Propidium Iodide)*, наранџасто-црвене боје, везује се за молекулу *ДНК* у једру, али само код ћелија са нарушеном ћелијском мембраном. Живе ћелије са интактном мембраном не дозвољавају улазак *PI*. Комбинацијом ових два бојења могуће је разликовати: вијабилне ћелије, ћелије у раној апоптози, ћелије у касној апоптози и некротичне ћелије.

На овај начин се квантитативно одређује однос ћелија у апоптози и некрози након третмана једињењима бакра.

Ћелије третиране IC_{50} концентрацијом одговарајућих бакарних комплекса, подигнуте су из плоча, више пута испране у ледено хладном *PBS*-у и суспендоване у *Binding buffer*-у у концентрацији од 10^6 ћелија/*mL*. По $100 \mu L$ ове ћелијске суспензије пребачено је у три епрувете од $5 mL$, пошто је експеримент извршен у трипликату и у три независна понављања. У сваку епрувету додато је по $5 \mu L$ *Annexin V-FITC* и $5 \mu L$ *Propidium Iodide (PI)*. Ћелије су кратко вортексоване и инкубиране 15 минута у мраку на собној температури. У последњем кораку је додато још $400 \mu L$ *Binding buffer*-а у сваку епрувету, након чега су резултати читавани проточним цитометром.

Добијене резултате смо обрадили и презентовали уз помоћ софтвера за анализу проточне цитометрије *FlowJo VX*.

ДЕТЕКЦИЈА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Осим одређивања односа ћелија у апоптози и некрози, наше истраживање је обухватило и утицај бакар(II) комплекса на ћелијски циклус ћелија тумора *U251*. Циљ је био да утврдимо да ли ове тестиране супстанце успоравају деобу туморских ћелија. Испитали смо на који начин једињења бакра утичу на расподелу ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса, користећи *PI* бојење и квантитативно мерење проточном цитометријом.

Принцип анализе ћелијског циклуса помоћу *PI* бојења заснива се на способности молекула *Propidium Iodide* да се везује за молекулу *ДНК*. Интензитет флуоресценције који емитује *PI* везан за *ДНК* у појединачним ћелијама омогућава одређивање фазе ћелијског циклуса у којој се ћелија налази. Проточна цитометрија

омогућава квантитативну анализу расподеле ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса.

Први корак подразумева одговарајући третман туморских ћелија концентрацијом једињења бакра (IC_{50} вредности). Након третмана ћелије су подигнуте трипсином и испране медијумом и два пута фосфатним пуфером. Након испирања, ћелије су фиксиране у ледено хладном 70% етанолу и чуване на 4 °C најмање 1 сат. Даље, ћелије су два пута испране у ледено хладном фосфатном пуферу (PBS), а затим третиране са 100 $\mu\text{g/mL}$ RNase и 200 μL раствора *Propidium Iodide*. Након 30-минутне инкубације у мраку на собној температури, додато је још 300 μL PBS-а, након чега су резултати читавани проточним цитометром.

Добијене резултате смо обрадили и представили помоћу софтвера за анализу проточне цитометрије *FlowJo Vx*.

АНАЛИЗА АПОПТОТИЧНИХ ПРОТЕИНА

Апоптозу можемо активирати двојачко, спољашњим путем и унутрашњим. У циљу детаљног одређивања механизма анитполиферативне активности једињења бакра мерили смо експресију есенцијалних протеина укључених у програмирану ћелијску смрт. Прецизније, анализирали смо експресију проапоптотског протеина *Bax*, антиапоптотског протеина *Bcl-2* као и присуство активне каспазе-3. Дакле, сврха анализе протеина апоптозе је била да се утврди да ли третиране малигно измењене ћелије показују промене у експресији протеина апоптозе односу на нетретиране. Прецизније, да ли бакарна једињења утичу на активност и експресију *Bax-a*, *Bcl-2* и активирани каспазе-3.

Први корак је обухватао 24-часовни третман туморских ћелија одговарајућом концентрацијом бакарних једињења (IC_{50} вредности).

Након третмана ћелије су подигнуте трипсином и испране једном медијумом, а затим два пута ледено хладним фосфатним пуфером (PBS).

Након фиксације и пермеабилizације у складу са упутством произвођача, неспецифично везивање антитела блокирано је додавањем козјег серума. Затим су ћелијама додавана одговарајућа примарна антитела, а уколико примарно антитело није било обележено, примењено је и секундарно антитело.

Након 30-минутне инкубације у мраку на собној температури, у сваку епрувету је додато још 300 μL фосфатног пуфера (PBS), а резултати су читавани проточним цитометром.

Просечан интензитет флуоресценције (*Mean Fluorescence Intensity – MFI*) за *Bax* и *Bcl-2* израчунаван је као однос између интензитета флуоресценције мереног молекула (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле. Даље, експресија активне каспазе-3 одређивана је анализом процента ћелија које испољавају флуоресценцију специфичну за овај активни протеин.

Након мерења, резултати су обрађени и визуализовани помоћу софтвера за анализу проточне цитометрије *FlowJo Vx*.

СТАТИСТИКА

Први корак у статистичкој анализи добијених резултата обухватао је је анализу дистрибуције података. У зависности од тога да ли су подаци били нормално распоређени или не, бирали смо одговарајући статистички тест. Зависност ефекта лека од његове концентрације испитивана је применом линеарне или логистичке регресије. Вредност p која је била мања од 0,05 је узимана за сигнификантну (статистички значајну) и приказивана је као “*” на графицима. Статистички програм коришћен у анализи добијених резултата је био SPSS v20.

Резултати су приказани у виду стубичастих, тачкастих и линеарних дијаграма, као и у табеларном облику.

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати наше студије обухватају анализу антипролиферативног ефекта *Cu(II)* комплекса на канцерске ћелије и фибробласте. Прецизније, детаљно је испитиван цитотоксични ефекат два једињења бакра и временским интервалима од 24, 48 и 72 часа.

Осим тога, анализиран је и антипролиферативни ефекат цисплатине и оксалиплатине на канцерске и немалигне ћелије у циљу поређења биолошког ефеката са једињењима бакра.

Метода коју смо користили за анализу биолошке активности је *MTT* тест.

УТИЦАЈ *Cu(II)* ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ *HeLa* ЋЕЛИЈА

Добијени резултати показују да третман *CuI* доводи до сигнификантног смањења вијабилности *HeLa* ћелија након 24 часа инкубације *in vitro*, и то при концентрацијама већим од 3 μM . Прецизније, при концентрацији од 10 μM , 30 μM и 100 μM дошло је до статистички значајног умањења пролиферације канцерских ћелија ($p < 0,05$, графикон 1). Ниже концентрације нису изазвале статистички значајне промене ($p > 0,05$ графикон 1). На основу добијених података израчуната IC_{50} вредност је износила $36.3 \pm 4.9 \mu\text{M}$.

Испитивањем биолошке активности *Cu2* једињења утврђено је да овај комплекс изазива значајно смањење стопе преживљавања *HeLa* ћелија већ при концентрацији од 10 μM ($p < 0,05$, графикон 1). Насупрот томе, третман једињењем бакра у концентрацијама нижим од 10 μM није довео до статистички значајног пада вијабилности у односу на контролне, нетретирание ћелије ($p > 0,05$). IC_{50} вредност за *Cu2* комплекс је износила $29.8 \pm 4.9 \mu\text{M}$.

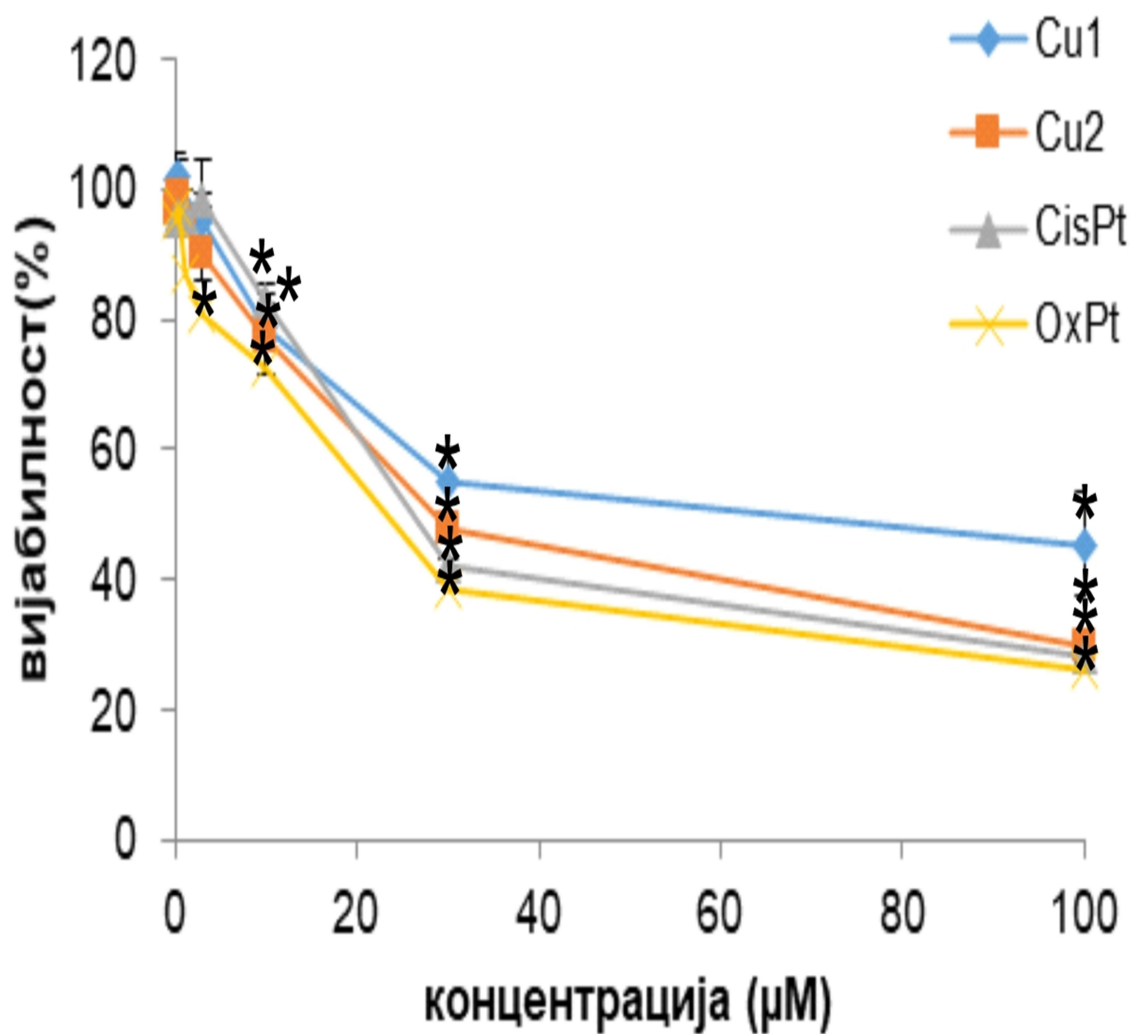
На основу свих претходно поменутих података можемо закључити да су једињења бакра *CuI* и *Cu2* показала снажан антипролиферативни ефекат већ након 24 часа инкубације.

Током тестирања антиканцерског дејства цисплатине на *HeLa* ћелије утврђено је да овај хемиотерапеутик индукује умањење пролиферације малигнућ ћелија већ при концентрацији од 10 μM , 30 μM и 100 μM ($p < 0,05$, графикон 1). У концентрацијама нижим од 10 μM овај хемиотерапеутик није изазвао статистички значајно смањење преживљавања *HeLa* ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину је износила $28.6 \pm 5.5 \mu\text{M}$.

После 24-часовног третмана *HeLa* ћелија оксалиплатином утврђено је да овај хемиотерапеутик испољава значајан цитотоксични ефекат при концентрацији од 3 μM ($p < 0,05$, графикон 1). При нижим моларним концентрацијама овај лек није имао значајан утицај на пролиферацију канцерских ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за оксалиплатину након 24 часа инкубације је износила $27.4 \pm 2.9 \mu\text{M}$.

Можемо закључити да цисплатина као и оксалиплатина показују снажан антиканцерски ефекат након 24 часа инкубације. Прецизније, за сва тестирана једињења (*CuI*, *Cu2*, цисплатина и оксалиплатина) добили смо сличне IC_{50} вредности.

HeLa 24h



Графикон 1. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија канцера цервикса након 24 часа инкубације

Након 48-часовног *in vitro* третмана *HeLa* ћелија једињењем *Cu1*, значајно смањење стопе преживљавања малигнућ ћелија примећено је већ при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Осим тога сигнификатан утицај на пролиферацију ћелија је демонстриран и при концентрацијама од $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ и $100 \mu\text{M}$. Супротно томе, применом нижих концентрација једињења бакра, односно $1 \mu\text{M}$ и $0,3 \mu\text{M}$, није дошло до статистички значајног умањења стопе преживљавања *HeLa* ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за *Cu1* након 48 часа инкубације је износила $23.7 \pm 2.1 \mu\text{M}$.

При тестирању антиканцерског ефекта *Cu2* једињења, значајно смањење стопе преживљавања забележено је већ при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Статистички значајно смањење преживљавања примећено је и при концентрацијама од $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ и $100 \mu\text{M}$. Супротно томе, применом нижих концентрација комплекса бакра, није дошло до статистички значајног умањења стопе преживљавања *HeLa* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* је износила $19.1 \pm 2.0 \mu\text{M}$.

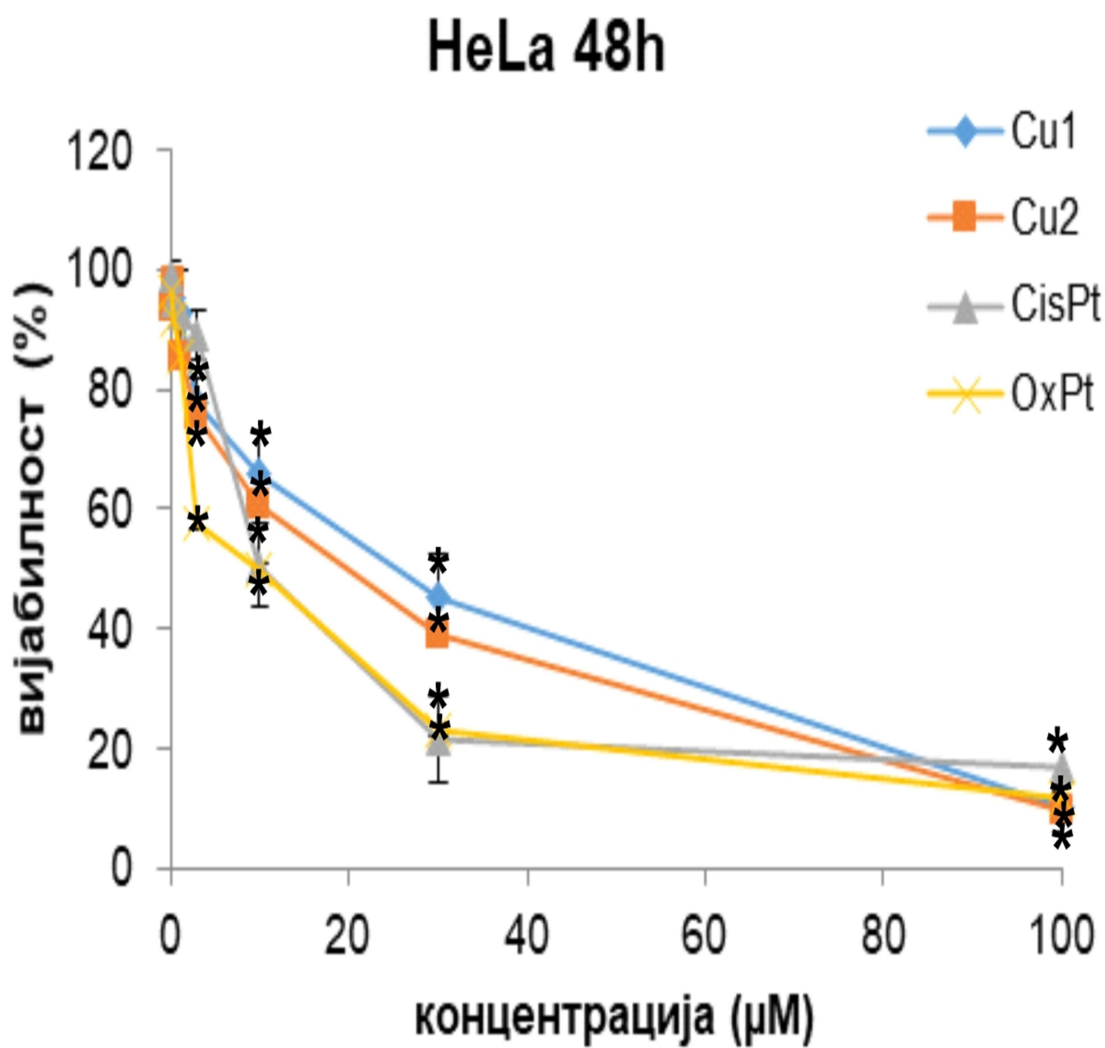
Можемо закључити да након 48 часова инкубације *Cu1* и *Cu2* комплекси показују снажана антитуморски ефекат.

Након третмана *HeLa* ћелија хемиотерапеутиком, цисплатином, значајан антипролиферативан ефекат је детектован при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Супротно томе, применом нижих концентрација комплекса, односно $0,3 \mu\text{M}$ и $1 \mu\text{M}$, није дошло до статистички значајног умањења стопе преживљавања *HeLa* ћелија ($p > 0,05$). IC_{50} вредност за цисплатину након 48 часова инкубације је износила $10.4 \pm 2.6 \mu\text{M}$.

При испитивању цитотоксичног дејства оксалиплатине након 48-часовног *in vitro* третмана *HeLa* ћелија, сигнификатан антипролиферативан ефекат забележен је већ при концентрацији од $1 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 2). Даље, при вишим концентрацијама такође је забележено сигнификатно смањење вијабилности. При моларности од $0,3 \mu\text{M}$ није забележен значајани антиканцерски ефекат ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за овај хемиотерапеутик је износила $9.7 \pm 1.5 \mu\text{M}$.

Можемо закључити да су цисплатина и оксалиплатина демонстрирали снажан антипролиферативни ефекат на *HeLa* ћелије.

кцкх



Графикон 2. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија канцера цервикса након 48 часова инкубације

При испитивању антиканцерског ефекта *Cu1* комплекса након 72-часовне култивације *HeLa* ћелија, установљено је да већ при концентрацији од $1 \mu\text{M}$ долази до статистички значајног смањења стопе преживљавања ($p < 0,05$, графикон 3). Супротно томе, применом ниже концентрације бакарног комплекса, односно $0,3 \mu\text{M}$, није забележено статистички значајно смањење преживљавања ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за *Cu1* је износила $17.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$.

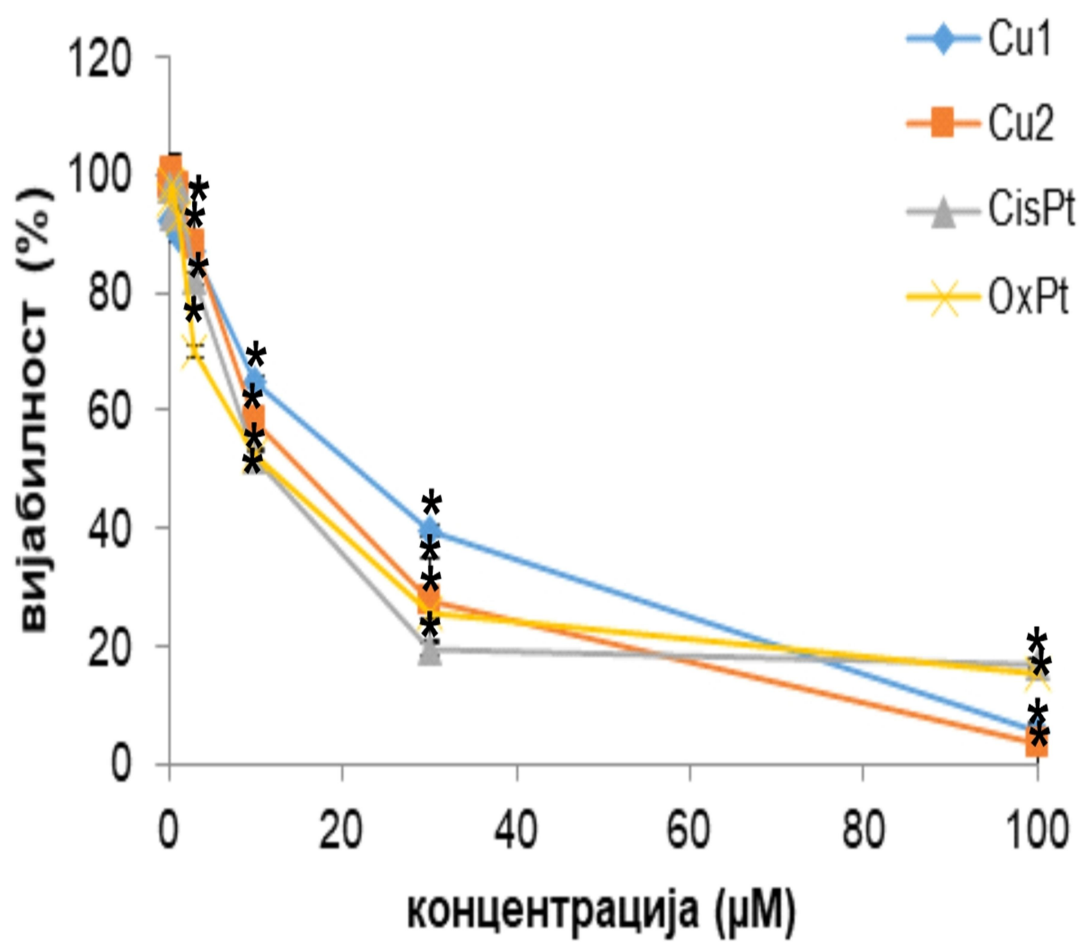
Тестирањем антиканцерског ефекта *Cu2* једињења на *HeLa* ћелије након 72-часовне култивације утврђено је да већ при концентрацији од $1 \mu\text{M}$ долази до сигнификатног умањења стопе преживљавања ($p < 0,05$, графикон 3). Додатно, при концентрацијама вишим од $1 \mu\text{M}$ забележено је значајно умањење вијабилности канцерских ћелија. Применом $0,3 \mu\text{M}$ *Cu2*, није забележено статистички значајно смањење преживљавања ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* је износила $11.9 \pm 2.2 \mu\text{M}$.

Након 72-часовне култивације *HeLa* ћелија у присуству хемитерапеутика цисплатине при концентрацији од $1 \mu\text{M}$ забележен је значајни антипролиферативни ефекат ($p < 0,05$, графикон 3). Супротно томе, при концентрацији комплекса бакра од $0,3 \mu\text{M}$ није показан сигнификантни антипролиферативни ефекат ($p > 0,05$). IC_{50} вредност за цисплатину након 72 часа инкубације је износила $9.3 \pm 1.7 \mu\text{M}$.

Током 72-часовне култивације *HeLa* ћелија, оксалиплатина је испољила снажан антипролиферативни ефекат, при концентрацији од $1 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 3). Такође, при концентрацији од $0.3 \mu\text{M}$ није забележено сигнификантан пад вијабилности канцерских ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $9.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$.

Тестирани хемиотерапеутци (цисплатина и оксалиплатина) су показали сигнификантни антипролиферативни ефекат на *HeLa* ћелије.

HeLa 72h



Графикон 3. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија канцера цервикса након 72 часа инкубације

УТИЦАЈ *Cu(II)* ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ *HCT 116* ЋЕЛИЈА

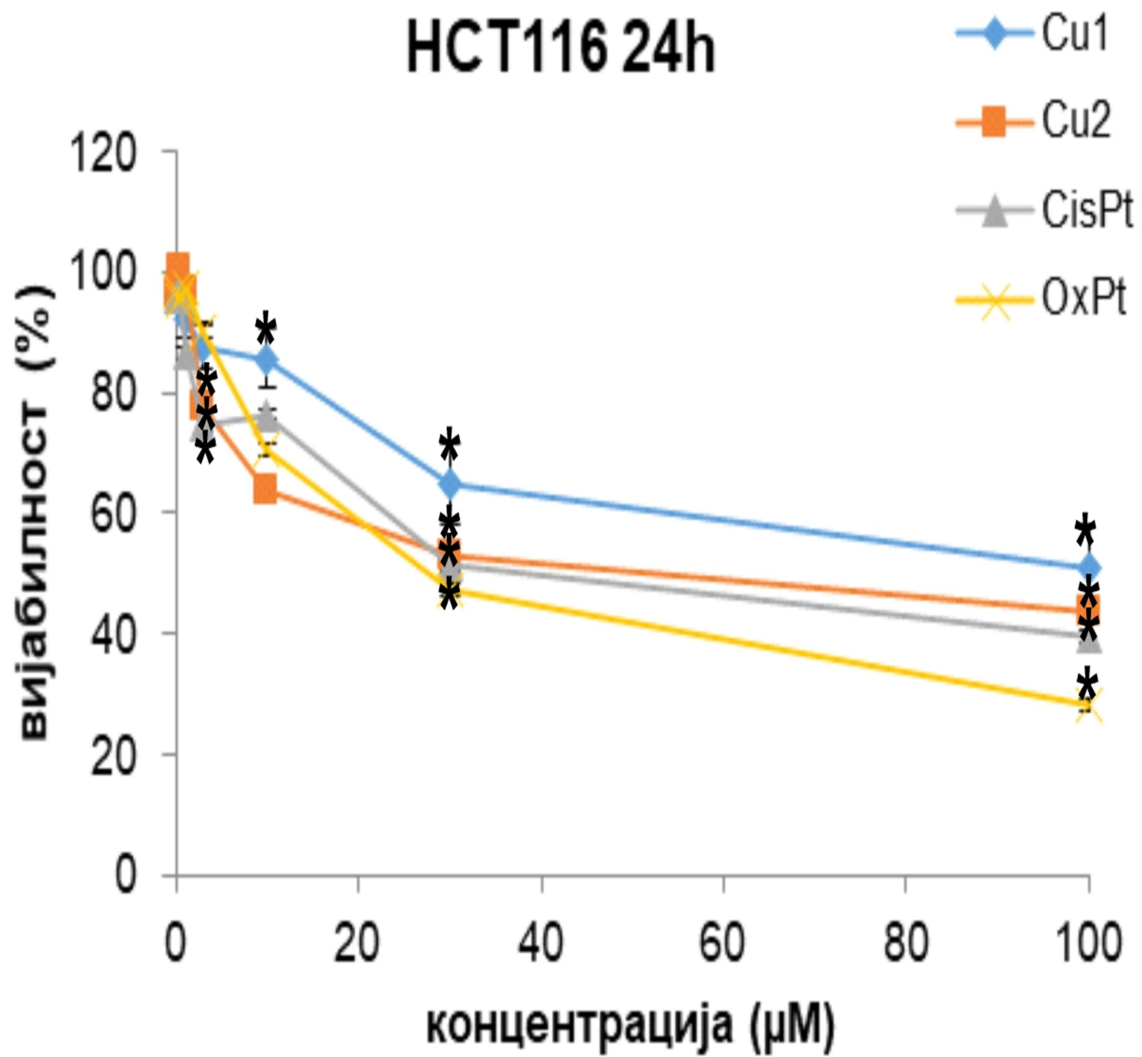
При тестирању натипролиферативног ефекта комплекса *CuI* на *HCT116* ћелијску линију након 24 часа култивације утврђено је да концентрација од $10 \mu M$ доводи до сигнификантног антитуморског ефекта. ($p < 0,05$ графикон 4). Такође, очекивано концентрације једињења бакра изнад $10 \mu M$ доводе до статистички значајног антитуморског ефекта. Насупрот томе, применом нижих концентрација није детектовано значајно умањење вијабилности ћелија ($p > 0,05$). IC_{50} вредност за *CuI* је износила $80.5 \pm 7.2 \mu M$

Сличан образац уочен је при анализи антиканцерског дејства *Cu2* на *HCT116* ћелије. Прцизније, након 24 часа инкубације, концентрација од $3 \mu M$ једињења бакра довела је до статистички сигнификантног смањења вијабилности ћелија канцера колона ($p < 0,05$ графикон 4). Међутим, концентрације од $0,3 \mu M$ и $1 \mu M$ нису показале значајан утицај на стопу преживљавања *HCT116* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* је износила $36.7 \pm 3.1 \mu M$.

Хемиотерапеутик цисплатина демонстрирао је снажно цитотоксично дејство на ћелије карцинома колона, *HCT116*, након 24 часа култивације. Значајно умањење стопе преживљавања канцерских ћелија детектовано је при концентрацији од $3 \mu M$ ($p < 0,05$ графикон 4). Ниже концентрације цисплатине нису довеле до значајних промена у вијабилности тестираних ћелија ($p > 0,05$). Пораст концентрације изнад $3 \mu M$ узроковао је још израженије смањење вијабилности *HCT116* ћелија ($p < 0,05$, графикон 4). Израчуната IC_{50} вредност за цисплатину је износила $37.2 \pm 4.4 \mu M$.

Испитивањем антиканцерског ефекта оксалиплатине показано је да она изазива статистички значајно смањење вијабилности *HCT116* ћелија при концентрацији од $3 \mu M$ ($p < 0,05$ графикон 4). Супротно томе ниже концентрације оксалиплатине нису довеле до значајног пада вијабилности канцерских ћелија колона ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $34,6 \pm 3,9 \mu M$.

Може се закључити да су након 24 часа култивације комплекси *Cu2*, као и цисплатина и оксалиплатина, испољили снажно антитуморско дејство, док је комплекс *CuI* показао умерен цитотоксични ефекат.



Графикон 4. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија канцера колона након 24 часа инкубације

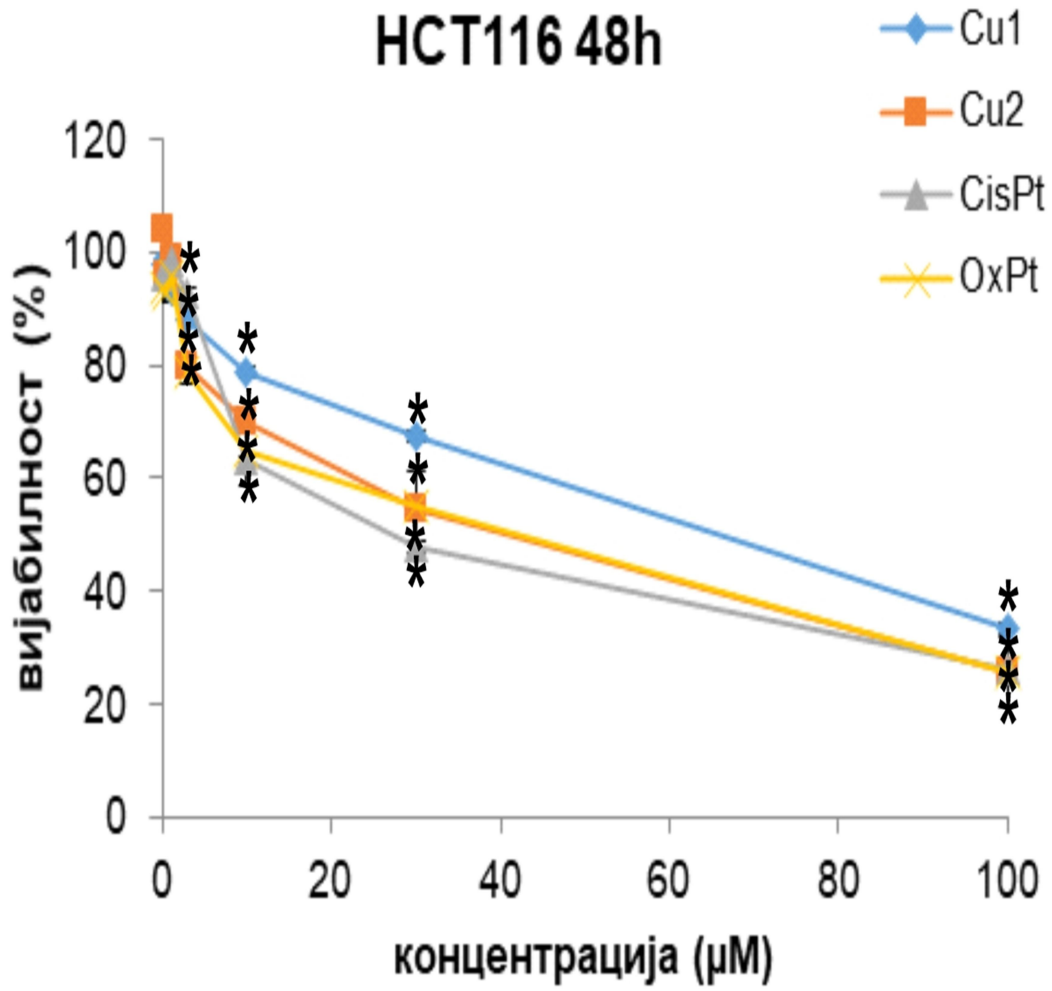
Након третмана једињењем бакра *Cu1* и 48-часовне култивације *HCT116* ћелија, статистички значајан антипролиферативни ефекат је детектован при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$ графикон 5). Даље повећање концентрације комплекса бакра довело је до још израженијег значајног пада вијабилности *HCT116* ћелија ($p < 0,05$). Ниже концентрације једињења бакра нису изазвале значајне промене у стопи преживљавања тестираних малигнућ ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* је износила $58.3 \pm 2.6 \mu\text{M}$.

У оквиру процене антиканцерског дејства једињења бакра *Cu2* на *HCT116* ћелије утврђено је да статистички значајно смањење вијабилности настаје већ при концентрацији од $3 \mu\text{M}$. Даље повећање концентрације комплекса *Cu2* резултовало је додатним, статистички значајним смањењем вијабилности канцерских ћелија ($p < 0,05$, графикон 5). Осим тога, ниже концентрације нису изазвале значајне промене у преживљавању малигнућ ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* је износила $32.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$.

Испитивањем дејства цисплатине након 48-часовне култивације утврђено је да овај цитостатик изазива статистички значајно смањење вијабилности *HCT116* ћелија при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 5). Насупрот томе, ниже концентрације цисплатине нису довеле до значајног умањења вијабилности малигнућ ћелија колоне ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за цисплатину је износила $25.3 \pm 3.9 \mu\text{M}$.

Антиканцерско дејство оксалиплатине на *HCT116* ћелије показало је да статистички значајно смањење стопе преживљавања настаје већ при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 5). Повећање концентрације довело је до додатног, статистички значајног умањења вијабилности малигнућ ћелија колоне. Ниже моларности оксалиплатине нису изазвале значајне промене у вијабилности ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $30,1 \pm 3,5 \mu\text{M}$.

Може се закључити да су након 48 часова култивације комплекси *Cu1*, *Cu2*, цисплатина и оксалиплатина, испољили снажно антитуморско дејство.



Графикон 5. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија канцера колона након 48 часова инкубације

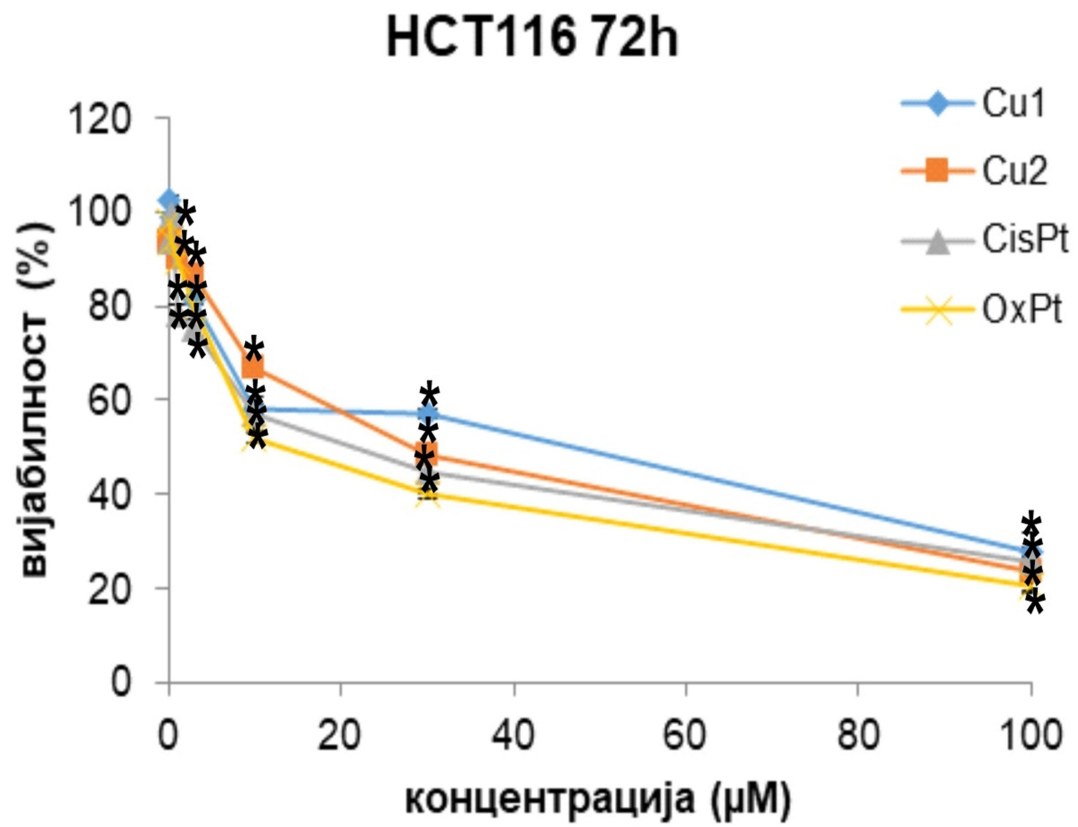
Испитивањем ефекта једињења бакра *Cu1* на *HCT116* ћелије након 72-часовне култивације утврђено је да концентрација од $1 \mu\text{M}$ доводи до статистички значајног смањења стопе преживљавања ($p < 0,05$, графикон 6). Ниже концентрације једињења бакра нису изазвале значајне промене у преживљавању канцерских ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* након 72 часа инкубације је износила $41.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$.

Тестирањем антитуморског дејства једињења *Cu2* на ћелије карцинома колона након 72-часовне култивације утврђено је да концентрација од $1 \mu\text{M}$ доводи до статистички значајног смањења вијабилности ($p < 0,05$, графикон 6). Даље, повећање концентрације изнад $1 \mu\text{M}$ резултовало је додатним статистички значајним падом вијабилности малигних ћелија. Насупрот томе, ниже концентрације комплекса *Cu2* нису изазвале значајне промене у преживљавању *HCT116* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* је износила $27.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$.

Након 72-часовне култивације *HCT116* ћелија у присуству цисплатине, концентрација од $1 \mu\text{M}$ довела је до статистички значајног смањења стопе преживљавања ћелија карцинома колона. Ниже концентрације цисплатине нису изазвале значајне промене у преживљавању ћелија ($p > 0,05$), док су више концентрације резултовале додатним статистички значајним смањењем стопе преживљавања *HCT116* ћелија ($p < 0,05$, графикон 6). Израчуната IC_{50} вредност за цисплатину је износила $17.9 \pm 2.4 \mu\text{M}$.

Оксалиплатина је испољила је снажно антиканцерско дејство на *HCT116* ћелије након 72-часовне култивације *in vitro*. Статистички значајно смањење стопе преживљавања забележено је већ при концентрацији од $1 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 6). Ниже концентрације комплекса нису изазвале значајне промене у виталности малигних ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $10,8 \pm 4.0 \mu\text{M}$.

Можемо закључити да су након 72 часа инкубације сва тестирана једињења (*Cu1*, *Cu2*, цисплатина и оксалиплатина) демонстрирала снажан антиканцерски ефекат на *HCT116* ћелије.



Графикон 6. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија канцера колона након 72 часа инкубације

УТИЦАЈ $Cu(II)$ ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ $U251$ ЋЕЛИЈА

Након тестирања ефекта бакар једињења CuI на $U251$ ћелије утврђено је да при концентрацији од $3 \mu M$ долази до статистички значајног смањења преживљавања ових ћелија ($p < 0,05$, графикон 7). Такође, при већим концентрацијама детектовано је смањење вијабилности малигнућ ћелија. Насупрот томе, применом комплекса CuI у нижим концентрацијама није забележена статистички значајна промена у преживљавању туморских ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за CuI након 24 часа инкубације је износила $37.4 \pm 2.1 \mu M$.

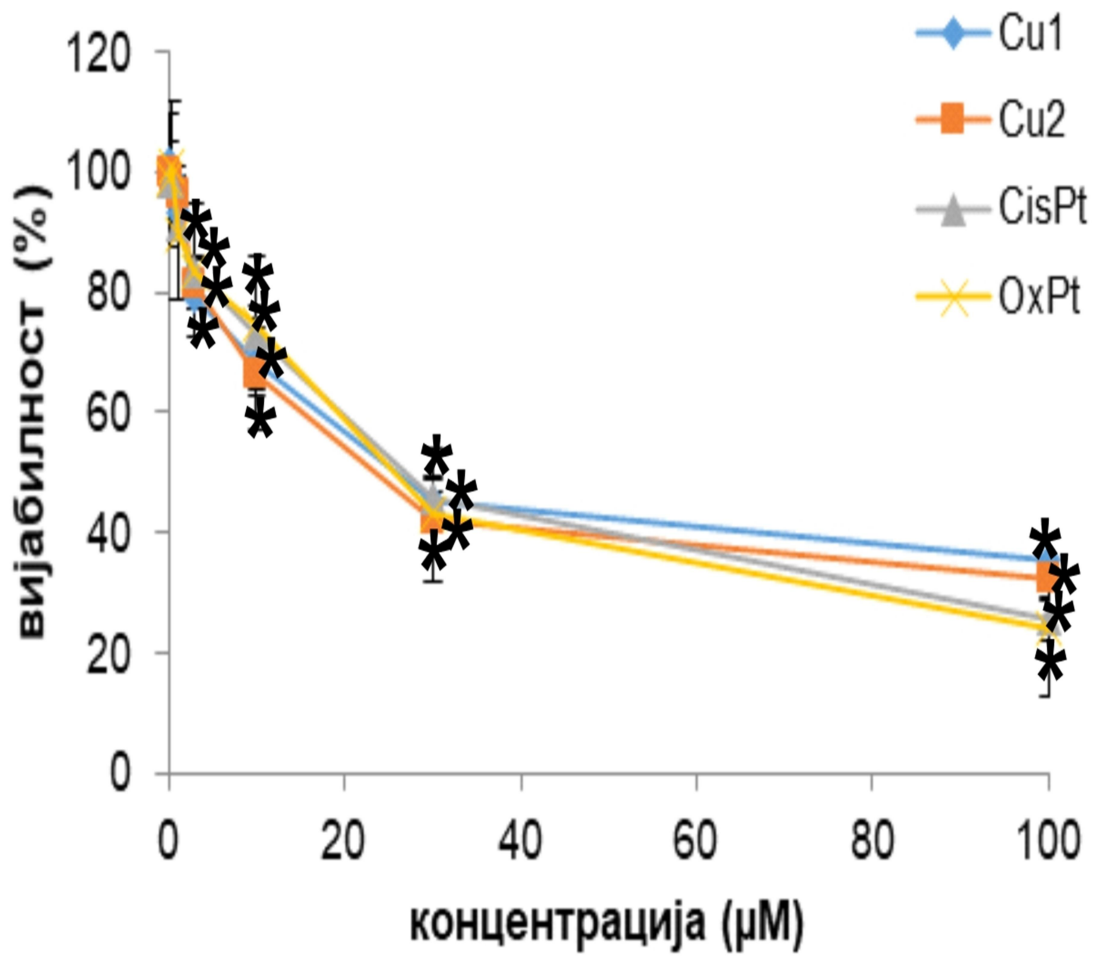
Комплекс бакра $Cu2$ након 24 часа култивације индуковао је статистички значајно смањење стопе преживљавања $U251$ ћелија већ при концентрацији од $3 \mu M$ ($p < 0,05$, графикон 7). Приликом примене $Cu2$ у нижим концентрацијама није детектован значајан пад вијабилности малигнућ ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за $Cu2$ је износила $42.1 \pm 2.6 \mu M$.

Цисплатина је индуковала статистички значајно смањење стопе преживљавања $U251$ ћелија при концентрацији од $3 \mu M$ ($p < 0,05$, графикон 7). Осим тога, применом виших концентрација овог хемиотерапеутика дошло је до значајног смањења вијабилности ћелија мултиформног глиобластома. Насупрот томе, ниже концентрације цисплатине нису довеле до сигнификантног смањења вијабилности $U251$ ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину је износила $38.7 \pm 2.3 \mu M$.

Оксалиплатина је показала снажан антипролиферативни ефекат на ћелије мултиформног глиобластома. Прецизније, након 24 часа у условима *in vitro* оксалиплатина је индуковала сигнификантни пад вијабилности $U251$ ћелија при моларној вредности од $3 \mu M$ ($p < 0,05$, графикон 7). Приликом примене овог хемиотерапеутика у нижим моларностима није детектовано статистички значајно смањење вијабилности $U251$ ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $36.3 \pm 2.5 \mu M$.

Може се закључити да су након 24 часа инкубације сва испитивана једињења (CuI , $Cu2$, цисплатина и оксалиплатина) показала изражен антиканцерски ефекат на $U251$ ћелије.

U251 24h



Графикон 7. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија мултиформног глиобластома након 24 часа инкубације

Након 48 часова култивације канцерских ћелија једињење бакра *Cu1* је индуковало сигнификантно смањење вијабилности ћелија мултиформног глиобластома при концентрацији од

($p < 0,05$, графикон 8). Насупрот томе, концентрације *Cu1* ниже од $1 \mu M$ нису изазвале статистички значајне промене у преживљавању *U251* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* након 48 часова инкубације је износила $10.3 \pm 1.6 \mu M$.

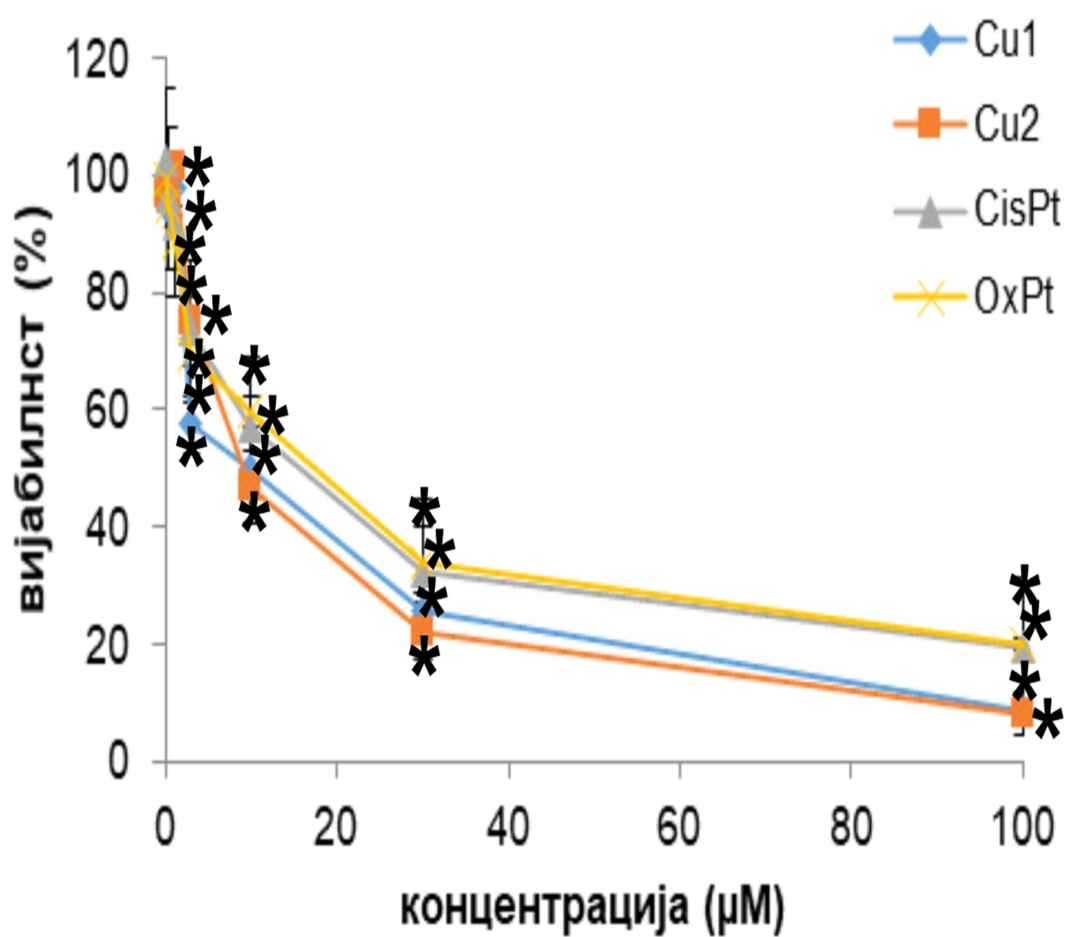
Након 48 часова инкубације концентрација од $1 \mu M$ комплекса *Cu2* довела је до статистички значајног смањења стопе преживљавања ћелија мултиформног глиобластома ($p < 0,05$, графикон 8). Више концентрације, такође су изазвале сигнификантно умањење стопе вијабилности *U251* ћелија. Насупрот томе, концентрације комплекса *Cu2* ниже од $1 \mu M$ нису довеле до статистички значајних промена у вијабилности ћелија мултиформног глиобластома ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* након 48 часова инкубације је износила $7.3 \pm 1.6 \mu M$.

Након 48 часова култивације цисплатина је при моларности од $1 \mu M$ индуковала сигнификантни пад вијабилности ћелија мултиформног глиобластома ($p < 0,05$, графикон 8). Концентрације цисплатине ниже од $1 \mu M$ нису довеле до статистички значајних промена у преживљавању *U251* ћелија ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину након 48 часова култивације износила је $12.4 \pm 2.4 \mu M$.

Тестирањем оксалиплатине показано је да при концентрацији од $1 \mu M$ долази до статистички значајног смањења стопе преживљавања *U251* канцерских ћелија ($p < 0,05$, графикон 8). Насупрот томе, третман оксалиплатином при концентрацијама нижим од $1 \mu M$ није довео до статистички значајних промена у вијабилности ћелија мултиформног глиобластома ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину је износила $17.5 \pm 2.3 \mu M$.

Резултати након 48 часова култивације показују да комплекси *Cu1*, *Cu2*, цисплатина и оксалиплатина испољавају изражено антитуморско дејство.

U251 48h



Графикон 8. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија мултиформног глиобластома након 48 часова инкубације

Тестирањем антиканцерског ефекта комплекса бакра *Cu1* у условима *in vitro* током 72 часа показано је да концентрација од $0,3 \mu\text{M}$ доводи до статистички значајног смањења стопе преживљавања ћелија мултиформног глиобластома ($p < 0,05$, графикон 9). Осим тога, при вишим концентрацијама од $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ такође је забележено значајно смањење преживљавања *U251* ћелија. Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* након 72 часа инкубације је износила $4.7 \pm 1.4 \mu\text{M}$.

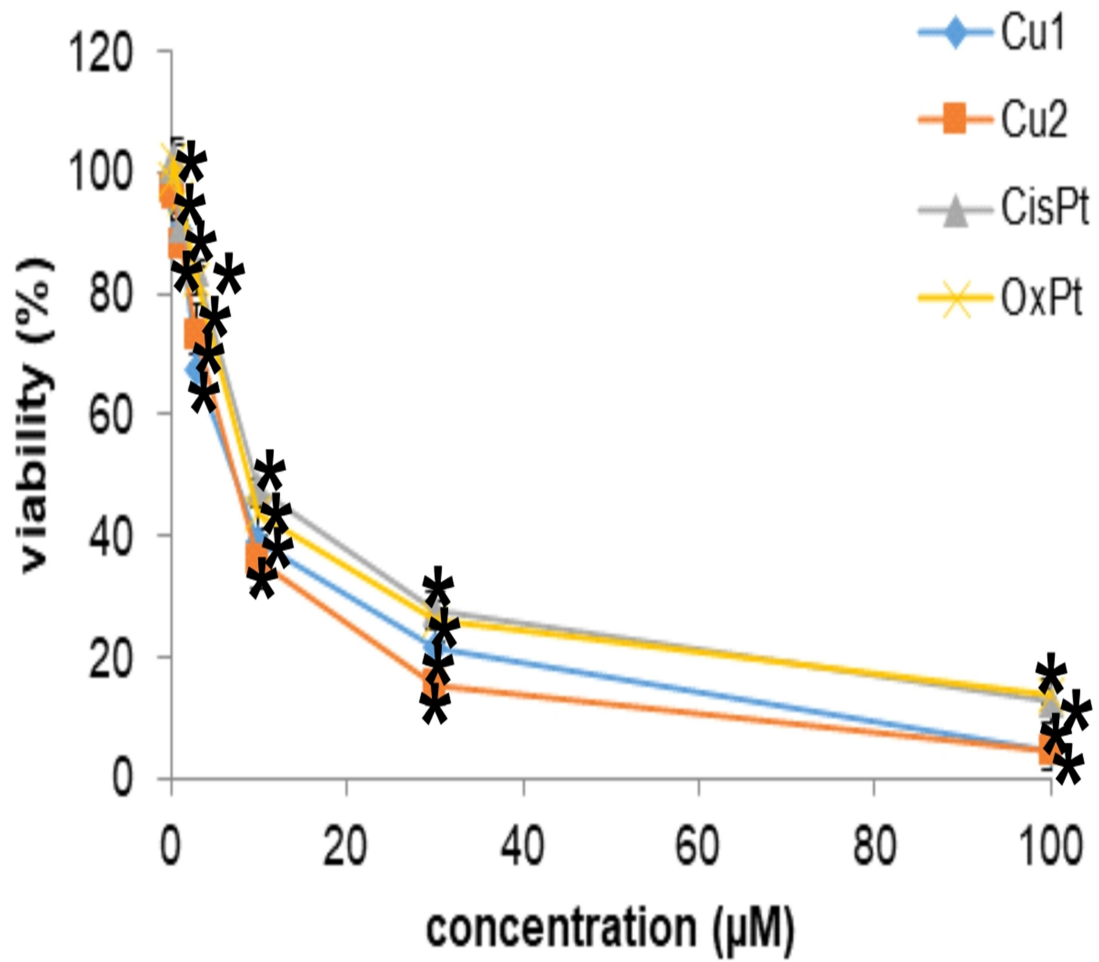
Тестирани комплекс бакра *Cu2* након 72 часа култивације *U251* ћелија показао је изражен антиканцерски ефекат. Прецизније, статистички значајно смањење стопе преживљавања ћелија мултиформног глиобластома забележено је при концентрацији комплекса од $0,3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 9). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* након 72 часа култивације износила $3.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$.

Истраживање је обухватило и испитивање антиканцерског ефекта цисплатине током 72-часовног третмана, при чему је утврђено да концентрација од $0,3 \mu\text{M}$ доводи до статистички значајног смањења вијабилности ћелија мултиформног глиобластома ($p < 0,05$, графикон 9). Веће концентрације цисплатине такође су изазвале значајно смањење стопе преживљавања *U251* ћелија ($p < 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину након 72 часа инкубације је износила $8.2 \pm 1.8 \mu\text{M}$.

Након 72-часовног третмана *U251* ћелија оксалиплатином, моларност од $0,3 \mu\text{M}$ индуковала је статистички значајно смањење вијабилности ($p < 0,05$, графикон 9). Осим тога, веће концентрације су такође индуковале сигнификантни пад преживљавања ћелија мултиформног глиобластома ($p < 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину након 72 часа култивације је износила $7.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$.

Резултати након 72 часа инкубације указују да испитивана једињења (*Cu1*, *Cu2*, цисплатина и оксалиплатина) демонстрирају снажан антиканцерски ефекат на *U251* ћелије.

U251 72h



Графикон 9. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија мултиформног глиобластома након 72 часа инкубације

УТИЦАЈ *Cu(II)* ЈЕДИЊЕЊА, ЦИСПЛАТИНЕ И ОКСАЛИПЛАТИНЕ НА ПРЕЖИВЉАВАЊЕ *MRC-5* ЋЕЛИЈА

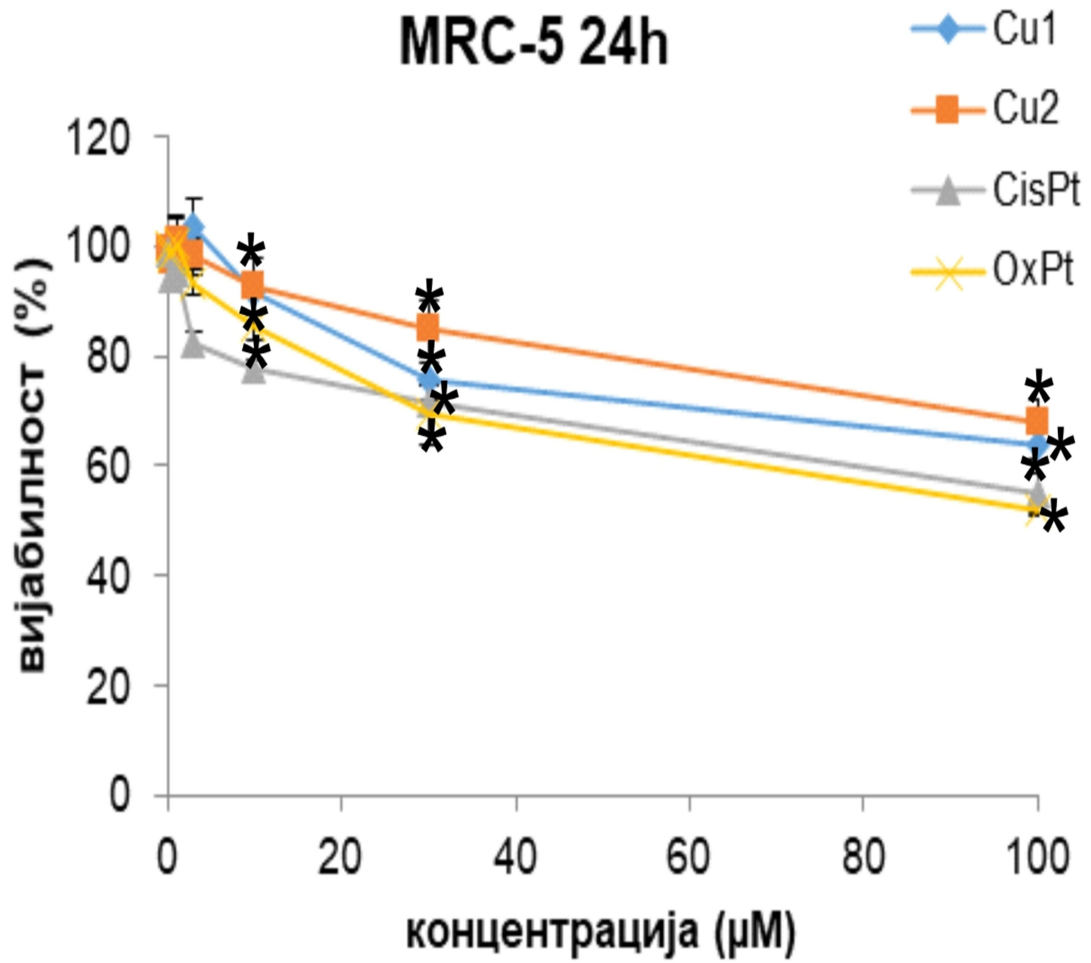
Након 24-часовног третмана *MRC-5* ћелија комплексом бакра *Cu1*, статистички значајно смањење вијабилности забележено је само при концентрацији од $30 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 10). Концентрације бакарног једињења ниже од $30 \mu\text{M}$ нису довеле до статистички значајних промена у преживљавању малигно неизмењених фибробласта ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* након 24 часа инкубације је износила $89.7 \pm 10.5 \mu\text{M}$.

После 24-часовне култивације *MRC-5* ћелија једињењем бакра *Cu2*, при концентрацији од $30 \mu\text{M}$ забележено је статистички значајно смањење стопе преживљавања фибробласта ($p < 0,05$, графикон 10). Концентрације комплекса *Cu2* ниже од $30 \mu\text{M}$ нису довеле до статистички значајних промена у преживљавању *MRC-5* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* након 24 часа култивације износила је $92.3 \pm 9.0 \mu\text{M}$.

Након тестирања биолошког ефекта цисплатине на малигно неизмењене фибробласте, сигнификантно смањење стопе преживљавања *MRC-5* ћелија забележено је при концентрацији од $10 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 10). Концентрације цисплатине ниже од $10 \mu\text{M}$ нису довеле до значајних промена у преживљавању испитиваних фибробласта ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину након 24 часа култивације је износила $68 \pm 9.8 \mu\text{M}$.

Наша студија је показала да оксалиплатина након 48-часовне култивације, доводи до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацији од $10 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 10). Концентрације оксалиплатине ниже од $10 \mu\text{M}$ нису изазвале статистички значајне промене у преживљавању малигно неизмењених фибробласта ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину након 24 часа инкубације је износила $62 \pm 7.3 \mu\text{M}$.

Можемо закључити да су испитивана једињења (*Cu1*, *Cu2*, цисплатина и оксалиплатина) показала веома слаб антиканцерски ефекат на *MRC-5* ћелије након 24 часа култивације.



Графикон 10. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија фибробласта након 24 часа инкубације

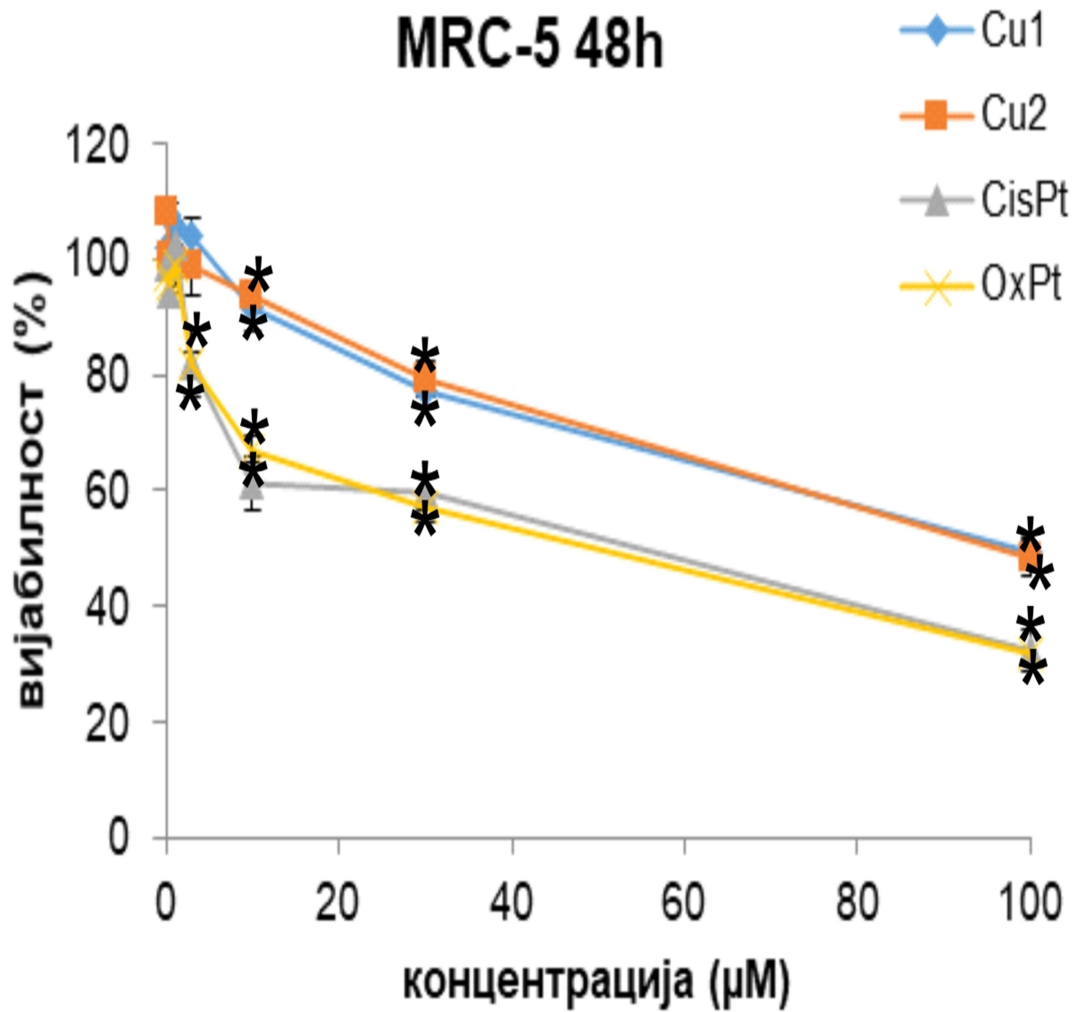
Након третмана *MRC-5* ћелија комплексом бакра *Cu1*, и 48-часовне култивације, статистички значајно умањење вијабилности забележено је при концентрацији од $10 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 11). Већа концентрација, $30 \mu\text{M}$ и $100 \mu\text{M}$, такође је довела до значајног смањења преживљавања фибробласта. Моларности комплекса *Cu1* ниже од $10 \mu\text{M}$ нису изазвале статистички значајне промене у преживљавању испитиваних ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* након 48 часова инкубације је износила $77.1 \pm 8.6 \mu\text{M}$.

Испитивањем цитотоксичног ефекта *Cu2* након 48 часова култивације, сигнификантно смањење вијабилности фибробласта детектовано је при концентрацији од $10 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 11). Моларности ниже од $10 \mu\text{M}$ нису довеле до статистички значајних промена у преживљавању *MRC-5* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* након 48 часова култивације износила је $82 \pm 8.1 \mu\text{M}$.

Третман фибробласта цисплатином након 48-часовне култивације довео је до статистички значајног смањења вијабилности малигно *MRC-5* ћелија при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 11). Такође, значајно смањење преживљавања фибробласта забележено је при већим концентрацијама цисплатине. Концентрације ниже од $3 \mu\text{M}$ нису изазвале статистички значајан пад вијабилности фибробласта ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину након 48 часова култивације је износила $42 \pm 5.9 \mu\text{M}$.

Оксалиплатина је након 48-часовне култивације демонстрирала снажан цитотоксични ефекат на фибробласте. Прецизније, статистички значајно смањење преживљавања *MRC-5* ћелија забележено је при концентрацији од $3 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, графикон 11). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину након 48 часова инкубације је износила $47 \pm 4.7 \mu\text{M}$.

На основу наведених резултата може се закључити да су комплекси бакра (*Cu* и *Cu2*) показали умерен цитотоксични ефекат на фибробласте, док су хемиотерапеутици цисплатина и оксалиплатина изазвали снажан цитотоксични ефекат на малигно неизмењене ћелије.



Графикон 11. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија фибробласта након 48 часова инкубације

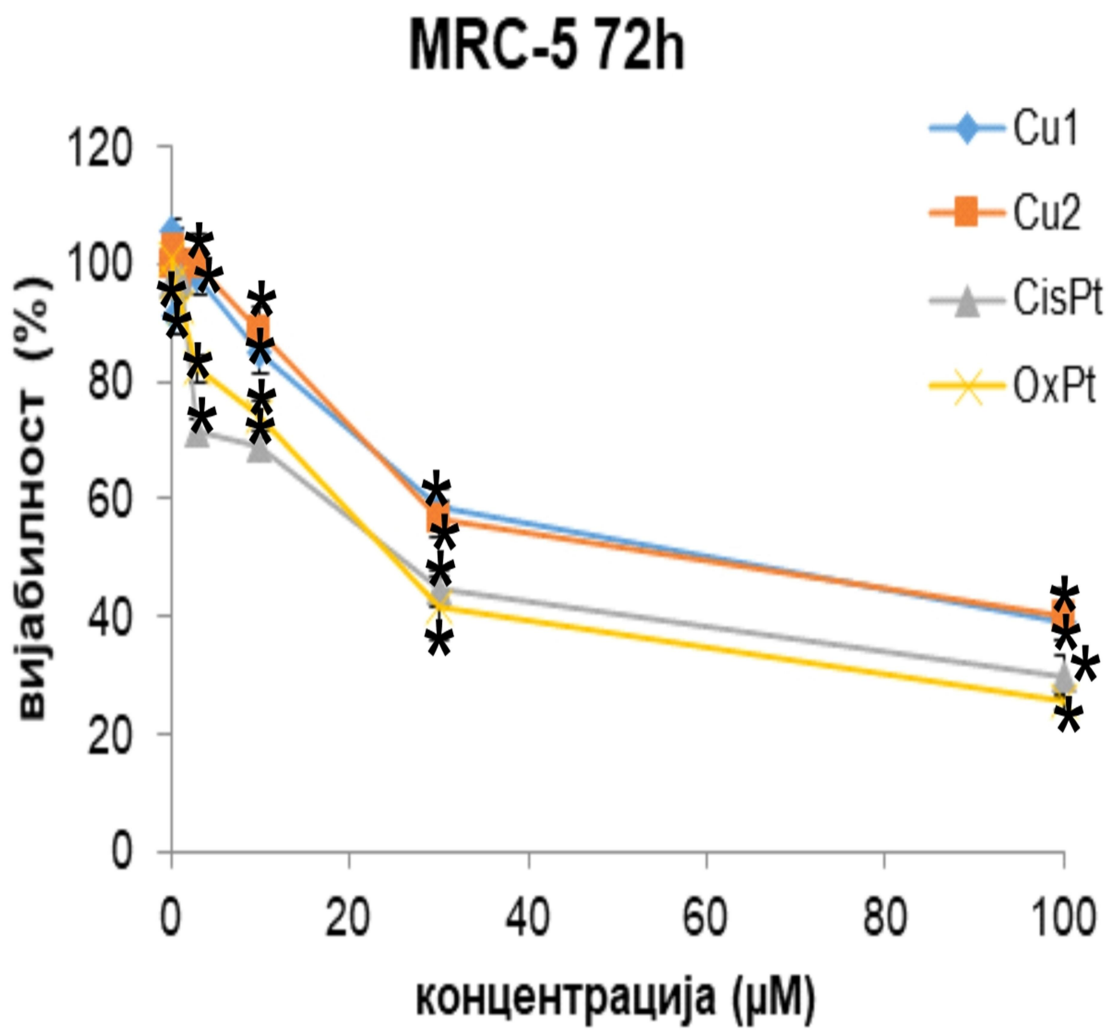
Наша студија је показала да након 72-часовног третмана *MRC-5* фибробласта комплексом бабра *Cu1*, концентрација од 3 μM доводи до статистички значајног смањења вијабилности ($p < 0,05$, графикон 12). Концентрације ниже од 3 μM нису изазвале статистички значајне промене у преживљавању *MRC-5* ћелија ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu1* након 72 часа инкубације је износила $67.3 \pm 5.7 \mu\text{M}$.

Након третмана фибробласта растућим концентрацијама *Cu2*, моларност од 3 μM довела је до сигнификантног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија ($p < 0,05$, графикон 12). Концентрације ниже од 3 μM нису довеле до статистички значајне промене у преживљавању фибробласта ($p > 0,05$). Израчуната IC_{50} вредност за *Cu2* након 72 часа култивације износила је $75.2 \pm 6.3 \mu\text{M}$.

Цисплатина је након 72-часовне култивације фибробласта индуковала статистички значајно смањење вијабилности већ при концентрацији од 1 μM ($p < 0,05$, графикон 12). Осим тога, моларности веће од 1 μM условиле су значајно смањење стопе преживљавања *MRC-5* ћелија. Насупрот томе, ниже моларности нису индуковале снажан цитотоксични ефекат ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за цисплатину након 72 часа инкубације је износила $27.4 \pm 3.6 \mu\text{M}$.

Испитивањем цитотоксичног ефекта оксалиплатине након 72-часовне култивације, статистички значајно смањење вијабилности фибробласта забележено је при концентрацији од 1 μM ($p < 0,05$, графикон 12). Ниже моларности овог хемотерапеутика нису условиле статистички значајан пад преживљавања малигно неизмењених фибробласта ($p > 0,05$). Добијена IC_{50} вредност за оксалиплатину након 72 часа инкубације је износила $25.5 \pm 2.1 \mu\text{M}$.

На основу резултата, може се закључити да комплекси бабра (*Cu1* и *Cu2*) имају умерену цитотоксичност према фибробластима, док су хемотерапеутици цисплатина и оксалиплатина значајно цитотоксични за малигно неизмењене ћелије.



Графикон 12. Утицај испитиваних једињења на вијабилност ћелија фибробласта након 72 часа инкубације

IC ₅₀ values [μ M]		Cu1	Cu2	CisPt	OxPt
	24h	37.4 \pm 2.1	42.1 \pm 2.6	38.7 \pm 2.3	36.3 \pm 2.5
U251	48h	10.3 \pm 1.6	7.3 \pm 1.6	12.4 \pm 2.4	17.5 \pm 2.3
	72h	4.7 \pm 1.4	3.6 \pm 1.7	8.2 \pm 1.8	7.4 \pm 1.7
	24h	36.3 \pm 4.9	29.8 \pm 4.3	28.6 \pm 5.5	27.4 \pm 2.9
HeLa	48h	23.7 \pm 2.1	19.1 \pm 2.0	10.4 \pm 2.6	9.7 \pm 1.5
	72h	17.3 \pm 1.5	11.9 \pm 2.2	9.3 \pm 1.7	9.4 \pm 1.6
	24h	80.5 \pm 7.2	36.7 \pm 3.1	37.2 \pm 4.4	34.6 \pm 3.9
HCT116	48h	58.3 \pm 2.6	32.3 \pm 2.9	25.3 \pm 3.9	30.1 \pm 3.5
	72h	41.1 \pm 1.9	27.4 \pm 1.6	17.9 \pm 2.4	10.8 \pm 4
	24h	89.7 \pm 10.5	92.3 \pm 9.0	68 \pm 9.8	62 \pm 7.3
MRC-5	48h	77.1 \pm 8.6	82 \pm 8.1	42 \pm 5.9	47 \pm 4.7
	72h	67.3 \pm 5.7	75.2 \pm 6.3	27.4 \pm 3.6	25.5 \pm 2.1

Табела 3. Приказ IC_{50} вредности испитиваних комплекса (*Cu1* и *Cu2*) и референтних хемиотерапеутика (цисплатин и оксалиплатин) на четири ћелијске линије након три експериментална временска периода.

ДЕЈСТВОМ $Cu(II)$ ЈЕДИЊЕЊА ИНДУКУЈЕ СЕ АПОПТОТСКИ ОДГОВОР У МАЛИГНИМ ЋЕЛИЈАМА МУЛТИФОРМНОГ ГЛИОБЛАСТОМА

Након што су резултати МТТ теста јасно показали да једињења бакра ($Cu1$ и $Cu2$) демонстрирају снажан антитуморски ефекат на малигне ћелије мултиформног глиобластома, следећи корак био је дефинисање цитотоксичног механизма ових комплекса.

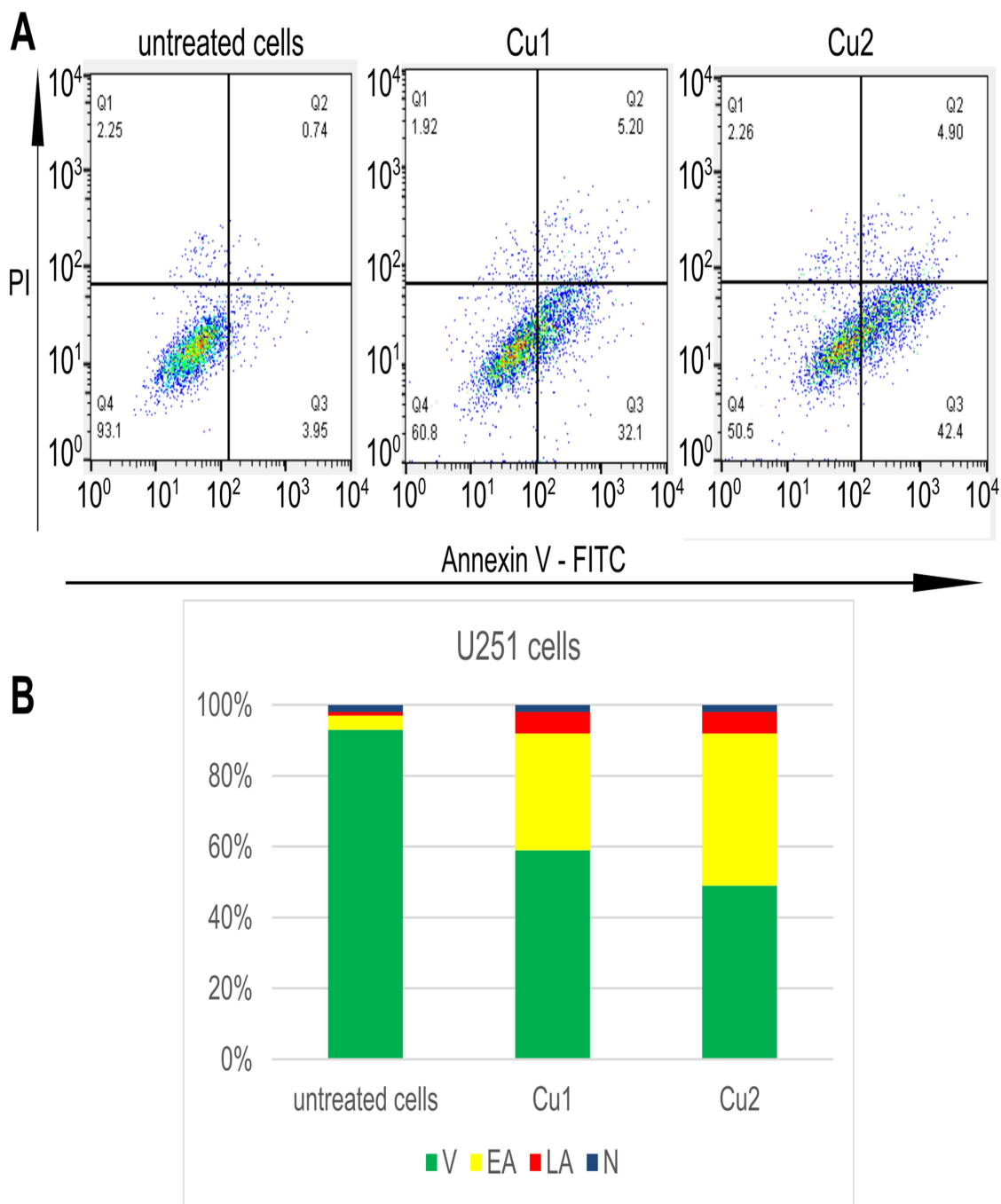
$U251$ ћелије изложене су IC_{50} концентрацијама комплекса бакра након чега су, по завршетку 24-часовне инкубације *in vitro*, подвргнуте бојењу *Annexin V-FITC* и *7AAD*. Као контрола коришћене су нетретиране $U251$ ћелије. Процент ћелије које се налазе у апоптози испитиван је *FACS* анализом.

У нетретираној, контролној популацији $U251$ ћелија утврђено је да је преко 90% ћелија било вијабилно. Имајући у виду да ова популација малигнућ ћелија није била изложена једињењима бакра, висок проценат вијабилних ћелија био је у потпуности очекиван (графикон 13).

Деловање комплекса бакра $Cu1$, индуковало је значајну редукцију вијабилности $U251$ ћелија и јасну активацију апоптозе. Прецизније, излагање ћелија концентрацији од $37.4 \pm 2.1 \mu M$ (IC_{50} концентрација) резултирало је раном апоптозом код преко 30% ћелија (графикон 13). Мањи проценат $U251$ ћелија детектован је у касној апоптози и некрози.

Третман $U251$ малигнућ ћелија бакарним комплексом $Cu2$ након 24-часовне инкубације *in vitro*, довео је до смањења стопе преживљавања ћелија услед активације ране апоптозе. Прецизније, излагање ћелија концентрацији од $37.4 \pm 2.1 \mu M$ (IC_{50} концентрација) $42.1 \pm 2.6 \mu M$ довело је до активације ране апоптозе и што је резултирало смањењем вијабилности малигнућ ћелија. Прецизније, око 40% ћелија детектовано је у раној апоптози. Веома мали проценат $U251$ ћелија детектован је у касној апоптози и некрози (графикон 13).

На основу претходно приказаних резултата можемо закључити да једињења бакра ($Cu1$ и $Cu2$) свој снажни антитуморски ефекат на $U251$ ћелије остварују активацијом ране апоптозе.



Графикон 13. *Annexin V-FITC* тест, проценат ћелија у раној апоптози, касној апоптози и некрози

ДЕЛОВАЊЕ КОМПЛЕКСА БАКРА НА ФАЗЕ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА ИСПИТИВАНИХ ТУМОРСКИХ ЋЕЛИЈА

Пад вијабилности канцерских ћелија потенцијалним хемиотерапеутицима могуће је индуковати активацијом апоптозе као и заустављањем ћелијског циклуса. Осим тога, врло често антитуморски ефекат је комбинација ова два механизма. У нашем истраживању показали смо да два комплекса бакра смањују вијабилност ћелија мултиформног глиобластома активацијом ране апоптозе. Стога, наредни корак у нашем истраживању је обухватио анализу утицаја комплекса бакра на одвијање ћелијског циклуса. Контролну популацију тестираних канцерских ћелија чине ћелије које нисмо третирали једињењима бакра. Малигно измењене ћелије су третиране једињењима бакра, односно њиховим израчунатим IC_{50} моларностима након 24 часа култивације *in vitro*.

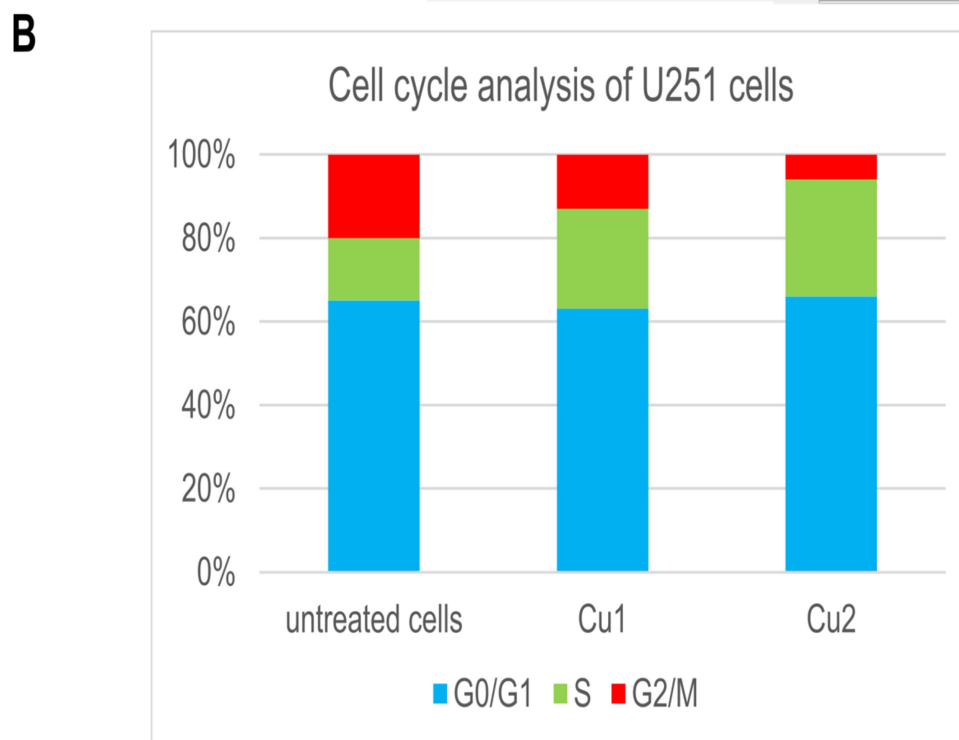
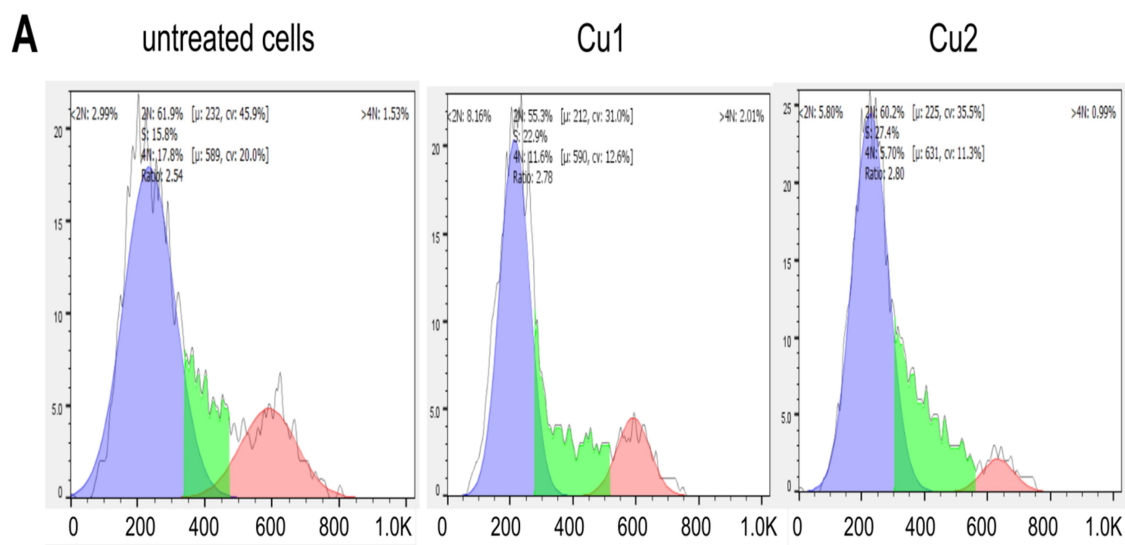
Анализа ћелијског циклуса спроведена је методом бојења пропидијум јодидом, којом је утврђена заступљеност испитиваних малигнућ ћелија у $G0/G1$, S и $G2/M$ фазама. Сви мерења су изведена у три независна понављања.

У контролној групи $U251$ ћелија, односно ћелија које нису биле изложене комплексима бакра, након 24 часа раста *in vitro* утврђено је да се преко 60% популације налази у $G0/G1$ фази. У S -фази је детектовано око 20% ћелија, док је преосталих 20% било распоређено у $G2/M$ фази ћелијског циклуса (графикон 14).

После третирања $U251$ ћелијске културе бакарним једињењем $Cu1$, тврђено је да се преко 60% популације налази у $G0/G1$ фази. У S -фази је забележено 30% ћелија, док је око 10% било распоређено у $G2/M$ фази ћелијског циклуса. Поређењем са контролном групом, забележено је значајно увећање удела ћелија које су се налазиле у S фази (графикон 14).

Третман $U251$ ћелија бакарним комплексом $Cu2$, током 24 часа *in vitro*, довео је до појачане заступљености ћелија у S -фази. Уочено је статистички значајно повећање процента ћелија у овој фази у поређењу са контролном групом нетретираних ћелија. Након третмана, преко 60% ћелија било је распоређено у $G0/G1$ фази, 30% у S -фази, док је око 10% популације лоцирано у $G2/M$ фази ћелијске деобе (графикон 14).

Резултати јасно показују да оба бакарна једињења $Cu1$ и $Cu2$ заустављају ћелијски циклус у S фази. Канцерске ћелије су чешће у S -фази него нормалне, па су осетљивије на лекове који блокирају репликацију. Многобројни хемиотерапеутици који се клинички користе делују специфично на S -фазу ћелијског циклуса. S -фаза специфични лекови често имају мање неспецифичних токсичности, јер циљано нарушавају процесе који су активни углавном у ћелијама које брзо пролазе кроз циклус (туморске).



Графикон 14. Утицај комплекса бакра на одвијање ћелијског циклуса малигнућег ћелијског глиобластома

КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ПОКРЕЋУ АПОПТОЗУ АКТИВИРАЊЕМ МИТОХОНДРИЈАЛНОГ ПУТА

Апоптоза се покреће путем два главна сигнална механизма — спољашњег и митохондријалног (унутрашњег) пута. Активација спољашњег пута захтева укључивање такозваних „рецептора смрти“ (*death receptors*), као и присуство каспазе-8, која је неопходна за даљи ток апоптотског процеса.

Активација митохондријалног пута апоптозе праћена је нарушавањем равнотеже између проапоптотичних и антиапоптотичних протеина. Прецизније, током овог процеса индукује се повећања експресије *Bax* молекула, уз истовремено смањење концентрације антиапоптотичног *Bcl-2*. Ова промена условљава транслокацију *Bax*-а ка спољашњој митохондријалној мембрани, што резултује њеном повећаном пропустљивошћу и ослобађањем цитохрома *c* у цитосол. Након што цитохром *c* доспе у цитозол, активира се каскада каспаза, пре свега каспаза-3, која директно покреће извршну фазу апоптозе. На тај начин унутрашњи митохондријални механизам постаје доминантан покретач програмиране ћелијске смрти.

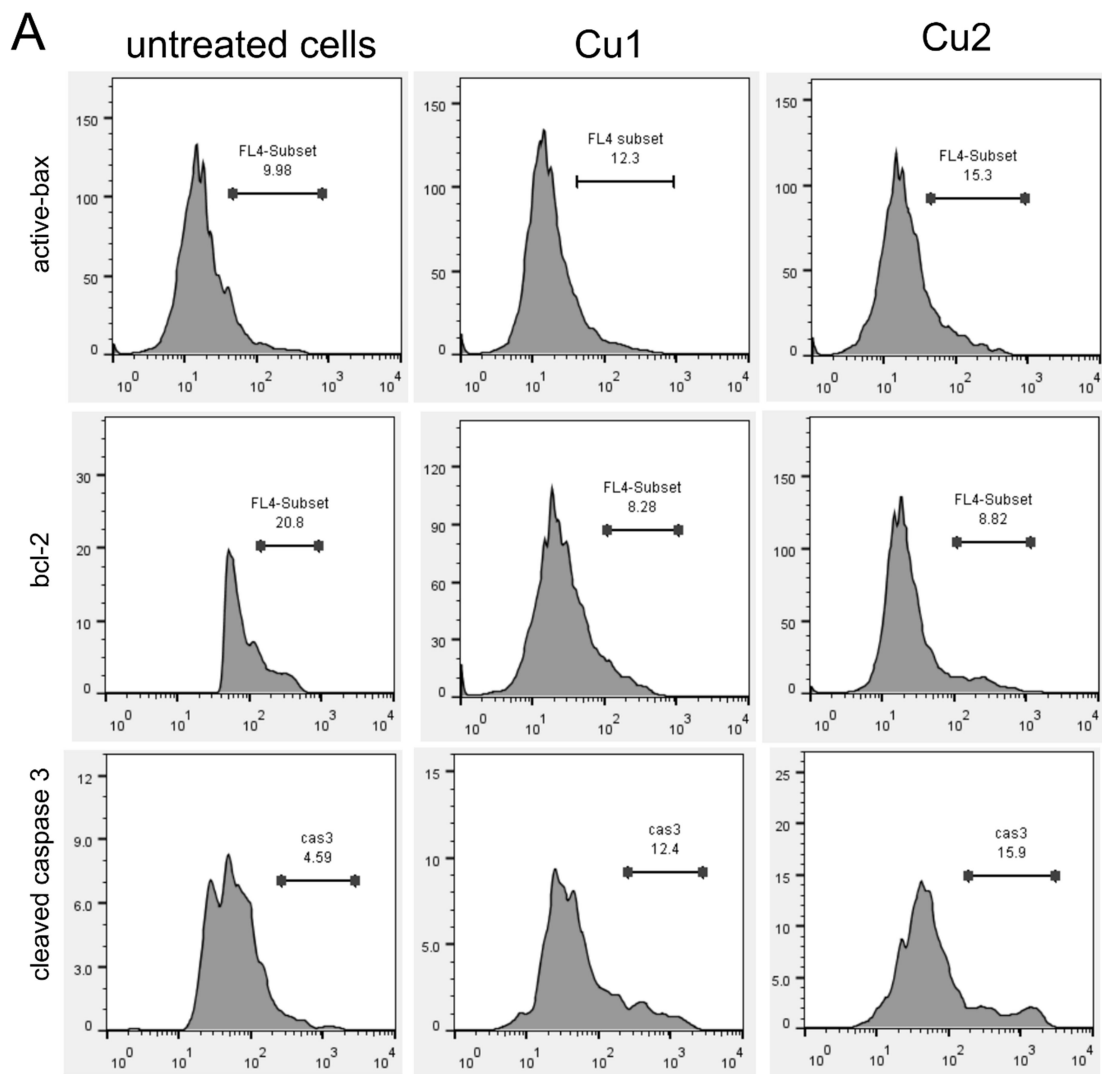
У оквиру ове студије анализирали смо механизам антиканцерског дејства два комплексна бакра, која смо обележили као *Cu1* и *Cu2*, на експресију и концентрацију *Bax*, *Bcl-2* и каспазе-3 у *U251* ћелијској линији након 24-часовне инкубације *in vitro*. Како бисмо разјаснили механизам апоптотског одговора, канцерске ћелије су обележаване специфичним примарним и секундарним антителима усмереним ка наведеним протеинима. Интензитет флуоресценције (*MFI* – *mean fluorescence intensity*) коришћен је као мера њихове концентрације и степена активације, док је проточна цитометрија омогућила и процену удела ћелија које показују позитиван сигнал флуоресценције.

Резултати нашег истраживања указују да једињења бакра индукују активирање митохондријалног пута апоптозе у тестираним *U251* ћелијама. Оба тестирана комплекса бакра довели су до статистички значајног пораста просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) *Bax* протеина, једног од главних иницијатора унутрашњег пута апоптозе.

Резултати наше студије показали су да третман једињењима бакра је довео до сигнификантног пада просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) антиапоптотичног *Bcl-2* протеина у *U251* ћелијама.

Можемо закључити да добијени резултати у нашој студији јасно показују да је у *U251* ћелијама третираним једињењима бакра дошло до смањења односа *Bcl-2/Bax*.

Након уоченог смањења односа *Bcl-2/Bax*, у нашем истраживању приступили смо мерењу концентрације активне ефекторске каспазе-3. Примењом једињења бакра *Cu1* и *Cu2* на *U251* ћелије детектовано је значајно повећање процента ћелија које показују флуоресценцију. Ови резултати јасно указују на активацију каспазе-3, што потврђује да комплекси бакра индукцијом унутрашњег апоптотског пута смањују вијабилност *U251* ћелија.



B

	untreated cells	Cu1	Cu2
bax MFI	96	138	173
bcl-2 MFI	209	77	86
cleaved cas-3 % of cells	3.7	13.6	15.9

Графикон 15. Промене у концентрацији и активацији апоптотских протеина под дејством комплекса бакра *Cu1* и *Cu2*

5. ДИСКУСИЈА

Канцерогенеза је један веома комплексан процес, где у основи ћелија „трпи“ малигну трансформацију. Малигне ћелије се одликују специфичним својствима чиме се издвајају од нормалних, здравих ћелија. Осим неконтролисана пролиферације, малигне ћелије имају потпуно измењен метаболизам у односу на здраве ћелије, и физиолошка функција је нарушена. Способност метастазирања додатно доприносе њиховој патогенези. Нарушавање ћелијског циклуса, избегавања апоптозе и повећане активности онкогена, све то подржава развој и прогресију малигнитета (94, 95, 140).

Као што је поменуто у претходном тескту „избегавање апоптозе“ има есенцијалну улогу у малигној трансформацији. Прецизније сигнални путеви који воде ка активацији апоптозе остају неактивни што условљава убрзану и неконтролисану пролиферацију. Из тог разлога активација сигналних апоптотских путева може бити пресудна за ефикасну антиканцерску терапију (94, 95).

Регулација апоптозе је веома сложена и у њој учествује велики број регулаторних молекула. На пример, *Bax* протеин делује као активатор програмиране ћелијске смрти, док *Bcl-2* инхибира активацију апоптозе (98, 108) . У малигно трансформисаним ћелијама уочава се повишена експресија антиапоптотичког *Bcl-2* протеина, док је истовремено смањена експресија и активност проапоптотичног *Bax* протеина. Ово може бити предуслов да се канцерогенеза неометано одвија (140).

Стога, циљ антиканцерске терапије треба бити стимулисање апоптозе, пре свега путем повећања експресије проапоптотичног *Bax* протеина, како би се малигно трансформисане ћелије усмериле ка програмираној ћелијској смрти.

Осим „избегавања“ апоптозе, канцерске ћелије се одликују и способношћу да наставе ћелијски циклус без улоге контролних механизма. Ћелијски циклус представља изузетно сложен и строго контролисан низ догађаја, па се ради јаснијег приказа уобичајено дели на четири основне фазе: *G1* (прва „гар“ фаза), *S* (фаза синтезе ДНК), *G2* (друга „гар“ фаза) и *M* (митоза). Фазе *G1*, *S* и *G2* заједно чине интерфазу – период током којег се ћелија припрема за наредну деобу. По завршетку митозе велики број ћелија напушта активан циклус и прелази у стање релативне неактивности, означено као G_0 . У овом режиму мировања могу боравити краће или дуже време, а понекад и трајно, зависно од њихових физиолошких улога и потреба ткива (160).

Већина малигно трансформисаних ћелија поседује ефикасне механизме који „заобилазе“ *G1* контролне тачке ћелијског циклуса, што доводи до неконтролисана деобе и појачане пролиферације (161, 162). Већина постојећих хемотерапеутика који се клинички примењују делују антипролиферативно током *S* фазе ћелијског циклуса, што резултује инхибицијом раста и диференцијације не само туморских, већ и малигно неизмењених ћелија (94, 95).

Можемо закључити да је неконтролисана пролиферација малигно трансформисаних ћелија последица инхибиције апоптозе и губитка контроле ћелијског циклуса. Такође, један од главних недостатака савремене терапије је недостатак селективности. Стога, примена хемотерапеутика често је повезана са озбиљним нежељеним ефектима код пацијената код којих је дијагностикован малигнитет (94, 95). С тим у вези, кључни терапијски циљ остаје развој нових хемотерапеутака који би истовремено имали висок ниво селективности према малигно измењеним ћелијама и минимизовали појаву нежељених ефеката.

У циљу индентификације потенцијалних антиканцерских лекова у првом кораку неопходно је спровести питавање њиховог цитотоксичног дејства на малигно трансформисане ћелије, најчешће коришћењем МТТ теста.

Наше истраживање је обухватило испитивање два новосинтетисана комплекса бакра (*Cu1* и *Cu2*) на вијабилност *HCT116*, *HeLa*, *U251* и *MRC-5* ћелија.

Коначни резултати наше студије недвосмислено показују да једињења бакра сигнификантно смањују вијабилност након *HeLa* након 72 часа инкубације. Осим тога снажана антиканцерски ефекат су показали хемиотерапеутици цисплатина и оксалиплатина. Такође, једињења бакра и хемиотерапеутици су демонстрирали снажан антитуморски ефекат на *HCT116* ћелије након 72 часа култивације.

Када говорио о малигним ћелијама мултиформног глиобластома треба напоменути да су сва испитивана једињења показала снажан антипролиферативни ефекат, што се може и потврдити веома ниским IC_{50} вредностима. Прецизније најснажнији антипролиферативни ефекат је показао комплекс Cu_2 . Осим тога једињење Cu_1 је имало ниже IC_{50} вредности у односу на цисплатину и оксалиплатину.

Када говоримо о здравим фибробластима, важно је рећи да су испитивана једињења бакра показала умерен цитотоксични ефекат након 72 часа култивације, Насупрот томе, хемиотерапеутици цисплатина и оксалиплатина након 72 часа инкубације демонстрирали су снажана цитотоксични ефекат. Можемо закључити да су наша једињења бакра која смо обележили као Cu_1 и Cu_2 показала знатно већи степен селективности у односу на тестиране цитостатике.

Када говоримо о комплексима који садрже бакар у својој структури истраживање од стране *Firmino GS* и сарадника је показало да $Cu(II)$ комплекси били ефикасни у редукцији раста *HCT-116* ћелија, што је показано и у нашем истраживању (163). Такође, студија *Liu Z* је обухватила истраживање биолошке активности $Cu(II)$ комплекса на вијабилност ћелија колоректалног карцинома. Показано је да је бакарно једињење ефективно инхибирао раст ћелија колоректалног карцинома (164).

Истраживање од стране *Naveen P* и сарадника је показало да $Cu(II)$ комплекси имају снажан антитуморски ефекат на ћелија карцинома цервикса, *HeLa*. Осим тога, комплекси бакра су показали снажнији антитуморски ефекат од цисплатине (165). Ови резултати су у сагласности са нашим резултатима. Такође, студија спроведена од стране *Barilli A* и сарадника је показала да једињења бакра имају снажана антитуморски ефекат на *HeLa* ћелије (166).

Глиобластом карактерише агресивност, инфилтрација у околно здраво ткиво и хетерогеност. Хирушким путем није могуће потпуно одтрсати тумор управо због инфилтративног раста. Из тог разлога синтетисани су многобројни метални комплекси који су у лабораторијским студијама показали снажну цитотоксичност на ћелије глиобластома у *in vitro* условима. Прецизније показано је да комплекси рутенијума веома ефикасно смањују вијабилност ћелија мултиформног глиобластома уз истовремену селективност према здравим ћелијама (167). Такође, студија спроведена од стране *Almeida, C. M.* и сарадника је показала да $Au(III)$ комплекс демонстрира снажан антиканцерски ефекат на *U251* ћелије (168). Димитријевић и сарадници су тестирали комплекс бакра “*BV-Cu*” и показали значајан цитотоксични ефекат на ћелије глиобластома., што је у сагласности са нашим резултатима (169).

У многим *in vitro* студијама комплекси бакра су показали висок степен селективности. *Chew* и сарадници су демонстрирали да $Cu(II)$ комплекси показују снажана антиканцерски ефекат на *MDA-MB-231* ћелијској линији док према малигно неизмењеним ћелијама *MCF-10A* цитотоксични ефекат је знатно слабији (170). Даље, *Mahendiran* и сарадници су синтетисали серију бакарних једињења и тестирали цитотоксичност на великом броју канцерских ћелијских линија као и на здоровој ћелијској линији *NHDF* (енг. *normal human dermal fibroblasts*). Комплекси су показали

снажан антипролиферативни ефекат на ћелије рака, али знатно слабији цитотоксични ефекат на *NHDF* чиме је јасно показана селективност (171). Истраживање, спроведено од стране *Rezaei* и сарадника је обухватило тестирање цитотоксичности комплекса бакра на ћелијама карцинома јетре (*HepG2*) и на мишјим нормалним фибробластима (*L929*). Показано је да комплекс снажан цитотоксични ефекат има на канцерске ћелије док је ефекат на *L929* био знатно слабији (172).

Сви претходно наведени резултати су у сагласности са резултатима у нашој студији.

Анализа добијених резултата бакарних једињења која смо означили као *Cu1* и *Cu2* је показала да снажан цитотоксични ефекат на *U251* ћелије је индукован активацијом ране апоптозе. Додатно, веома мали проценат ћелија које су показале некротичне карактеристике потврђује да је доминантни механизам деловања ових једињења управо програмирана ћелијска смрт, а не некроза.

Студија дизајнирана од стране *Hussain* и сарадника је јасно показала да су $Cu(II)$ комплекси демонстрирали снажан антитуморски ефекат на *MCF-7* (ћелије карцинома дојке) активацијом ране апоптозе (173). Иако комплекси бакра у овој студији нису тетсирани на *U251* ћелије (као што је случај у нашој студији), механизам антитуморског дејства једињења бакра је идентичан. Истраживање *Medeiros* и сарадника је показало да комплекси бакра поседују снажан антитуморски ефекат индукцијом ране апоптозе (174). Даље, студија *O'Sullivan* и сарадника је показала да једињења бакра своју биолошку активност заснивају на индукцији ране апоптозе (175).

На основу претходно поменутих података можемо закључити да једињења бакра свој антипролиферативни ефекат у највећем броју случајева заснивају на активацији апоптозе.

Осим апоптозе, у оквиру наше студије испитали смо и расподелу туморских ћелија у појединим фазама ћелијског циклуса након третмана бакарним једињењима *Cu1* и *Cu2*. Наши налази показују да оба испитивана бакарна комплекса, *Cu1* и *Cu2*, изазивају акумулацију туморских ћелија у *S*-фази, што указује на блокаду процеса репликације ДНК. Будући да се малигне ћелије знатно брже умножавају и већи део времена проводе у *S*-фази у поређењу са нормалним ћелијама, оне су посебно подложне супстанцама које ремете синтезу ДНК и тиме ефикасније реагују на овај тип терапијског деловања. Студија *Mahendiran* и сарадника је показала да комплекси бакра свој антипролиферативни ефекат заснивају на засунављању ћелијског циклуса у *S*-фази, што је у сагласности са нашим резултатима (171). Такође, истраживање *Arikrishnan* и сарадника је показало да $Cu(II)$ комплекси засунављају ћелијски циклус у *S*-фази (176). Насупрот томе, студија *Dimitrijević* и сарадника је показала да комплекси бакра индукују застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса.

Можемо закључити да комплекси бакра осим активације апоптозе свој антитуморски ефекат могу испољити заустављањем ћелијског циклуса у различитим фазама (у зависности од структуре комплекса, лиганда, типа ћелијске линије и дозе).

Резултати нашег истраживања показују да третман *U251* ћелија једињењима бакра (*Cu1* и *Cu2*) индукује повећање концентрације роапоптотичког протеина *Bax*, док истовремено долази до смањења експресије антиапоптотичког протеина *Bcl-2*. Такође, анализа односа *Bcl-2/Bax* јасно и недвосмислено указује да ова једињења бакра покрећу апоптозу преко унутрашњег, митохондријалног пута. Ово је додатно потврђено

повећаном фракцијом ћелија које показују активност егзекуторске каспазе 3, што јасно указује на покретање апоптозног пута (171).

Многи радови су у сагласности са нашим резултатима, односно показано је да бакарни комплекси активирају унутрашњи митохондријални пут мењајући однос *Bcl-2/Bax* и активирањем каспазом 3 (172, 173).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу обимних експерименталних резултата из нашег истраживања могу се извући следеће кључне поуке:

1. Синтетисана једињења бакра *CuI* и *Cu2* су демонстрирала сигнификантан антиканцерски ефекат на тестираним *HCT116*, *HeLa*, *U251* ћелијама уз велики степен селективности (минималан антитуморски ефекат) према малигно неизмењеним ћелијама фибробластима, *MRC-5*.

2. Најснажнији антитуморски ефекат *Cu(II)* једињења су показала на ћелије мултиформног глиобластома, *U251*.

3. Снажан цитотокични ефекат два једињења бакра на ћелије мултиформног глиобластома је постигнут индукцијом ране апоптозе.

4. Примењени бакарни комплекси доводили су до нарушавања нормалног протока ћелијског циклуса у канцерским *U251* ћелијама, што је резултирало значајним смањењем стопе њиховог преживљавања.

5. Поред инхибиције ћелијског циклуса, наши резултати показују да бакарни комплекси значајно смањују однос *Bcl-2/Bax* молекула код ћелија мултиформног глиобластома, што активира каспазу-3 и покреће митохондријски механизам апоптозе

РЕФЕРЕНЦЕ

1. Vezzani B, Carinci M, Previati M, Giacobazzi S, Della Sala M, Gafà R, Lanza G, Wieckowski MR, Pinton P, Giorgi C. Epigenetic Regulation: A Link between Inflammation and Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1221.
2. Maiuri AR, O'Hagan HM. Interplay Between Inflammation and Epigenetic Changes in Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;144:69-117.
3. Birkett N, Al-Zoughool M, Bird M, Baan RA, Zielinski J, Krewski D. Overview of biological mechanisms of human carcinogens. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2019;22(7-8):288-359.
4. Navarro C, Ortega Á, Santeliz R, Garrido B, Chacín M, Galban N, Vera I, De Sanctis JB, Bermúdez V. Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: Emerging Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Pharmaceutics*. 2022;14(6):1303.
5. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med*. 2018;7(12):6124-36.
6. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(7):912-19.
7. Végran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2011 ;71(7):2550-60.
8. Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, Tanson K, Philp N, Curry J, Martinez-Outschoorn U. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol*. 2017;44(3):198-203.
9. Li T, Copeland C, Le A. Glutamine Metabolism in Cancer. 2021. In: Le A, editor. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*. 2nd edition. Cham (CH): Springer; 2021.
10. Cheng H, Wang M, Su J, Li Y, Long J, Chu J, Wan X, Cao Y, Li Q. Lipid Metabolism and Cancer. *Life (Basel)*. 2022;12(6):784.
11. Koundouros N, Pouligiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(1):4-22.
12. Rozeveld CN, Johnson KM, Zhang L, Razidlo GL. KRAS Controls Pancreatic Cancer Cell Lipid Metabolism and Invasive Potential through the Lipase HSL. *Cancer Res*. 2020 Nov 15;80(22):4932-45.
13. Castelli S, De Falco P, Ciccarone F, Desideri E, Ciriolo MR. Lipid Catabolism and ROS in Cancer: A Bidirectional Liaison. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5484.
14. Li T, Copeland C, Le A. Glutamine Metabolism in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1311:17-38.
15. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2010 Aug;35(8):427-33.
16. Mossmann D, Müller C, Park S, Ryback B, Colombi M, Ritter N, Weißenberger D, Dazert E, Coto-Llerena M, Nuciforo S, Blukacz L, Ercan C, Jimenez V, Piscuoglio S, Bosch F, Terracciano LM, Sauer U, Heim MH, Hall MN. Arginine reprograms metabolism in liver cancer via RBM39. *Cell*. 2023;186(23):5068-83.
17. Massagué J. TGF- β signaling in development and disease. *FEBS Lett*. 2012;586(14):1833.

18. Beck C, Schreiber H, Rowley D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Tech.* 2001;52(4):387-95.
19. Rodríguez-García A, Samsó P, Fontova P, Simon-Molas H, Manzano A, Castaño E, Rosa JL, Martínez-Outshoorn U, Ventura F, Navarro-Sabaté À, Bartrons R. TGF-β1 targets Smad, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways to induce PFKFB3 gene expression and glycolysis in glioblastoma cells. *FEBS J.* 2017;284(20):3437-54.
20. Yuan X, Ruan W, Bobrow B, Carmeliet P, Eltzschig HK. Targeting hypoxia-inducible factors: therapeutic opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2024;23(3):175-200.
21. Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(11):865-73.
22. Alves ACS, Dias RA, Kagami LP, das Neves GM, Torres FC, Eifler-Lima VL, Carvalho I, de Miranda Silva C, Kawano DF. Beyond the "Lock and Key" Paradigm: Targeting Lipid Rafts to Induce the Selective Apoptosis of Cancer Cells. *Curr Med Chem.* 2018;25(18):2082-4.
23. Giri A, Hong IS, Kwon TK, Kang JS, Jeong JH, Kweon S, Yook S. Exploring therapeutic and diagnostic potential of cysteine cathepsin as targets for cancer therapy with nanomedicine. *Int J Biol Macromol.* 2025;315:144324.
24. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(8):347-54.
25. Ahamed A, Hosea R, Wu S, Kasim V. The Emerging Roles of the Metabolic Regulator G6PD in Human Cancers. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24):17238.
26. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell.* 2014;25(3):304-17.
27. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):994-1013.
28. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* 2004;64(7):2627-33.
29. Liu Y, Gu W. The complexity of p53-mediated metabolic regulation in tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 2022;85:4-32.
30. Kang J, Gallucci S, Pan J, Oakhill JS, Sanij E. The role of STK11/LKB1 in cancer biology: implications for ovarian tumorigenesis and progression. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1449543.
31. Bourouh M, Marignani PA. The Tumor Suppressor Kinase LKB1: Metabolic Nexus. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:881297.
32. Keerthana CK, Rayginia TP, Shifana SC, Anto NP, Kalimuthu K, Isakov N, Anto RJ. The role of AMPK in cancer metabolism and its impact on the immunomodulation of the tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2023;14:1114582.
33. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J.* 2008 ;412(2):179-90.
34. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(9):648-57.
35. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol.* 2008;28(12):4104-15.
36. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL, Hopper JL, Nielsen HR, Lee A, Yang X, McGuffog L, Parsons MT, Andrulis IL, Arnold N, Belotti M, Borg Å, Buecher B,

Buyss SS, Caputo SM, Chung WK, Colas C, Colonna SV, Cook J, Daly MB, de la Hoya M, de Pauw A, Delhomelle H, Eason J, Engel C, Evans DG, Faust U, Fehm TN, Fostira F, Fountzilias G, Frone M, Garcia-Barberan V, Garre P, Gauthier-Villars M, Gehrig A, Glendon G, Goldgar DE, Golmard L, Greene MH, Hahnen E, Hamann U, Hanson H, Hassan T, Hentschel J, Horvath J, Izatt L, Janavicius R, Jiao Y, John EM, Karlan BY, Kim SW, Konstantopoulou I, Kwong A, Laugé A, Lee JW, Lesueur F, Mebirouk N, Meindl A, Mouret-Fourme E, Musgrave H, Ngeow Yuen Yie J, Niederacher D, Park SK, Pedersen IS, Ramser J, Ramus SJ, Rantala J, Rashid MU, Reichl F, Ritter J, Rump A, Santamariña M, Saule C, Schmidt G, Schmutzler RK, Senter L, Shariff S, Singer CF, Southey MC, Stoppa-Lyonnet D, Sutter C, Tan Y, Teo SH, Terry MB, Thomassen M, Tischkowitz M, Toland AE, Torres D, Vega A, Wagner SA, Wang-Gohrke S, Wappenschmidt B, Weber BHF, Yannoukakos D, Spurdle AB, Easton DF, Chenevix-Trench G, Ottini L, Antoniou AC. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J Clin Oncol*. 2022 May 10;40(14):1529-41.

37. 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.

38. Cheng HH, Shevach JW, Castro E, Couch FJ, Domchek SM, Eeles RA, Giri VN, Hall MJ, King MC, Lin DW, Loeb S, Morgan TM, Offit K, Pritchard CC, Schaeffer EM, Szymaniak BM, Vassy JL, Katona BW, Maxwell KN. BRCA1, BRCA2, and Associated Cancer Risks and Management for Male Patients: A Review. *JAMA Oncol*. 2024;10(9):1272-81.

39. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. 2009;15(21):6479-83.

40. Li B, Simon MC. Molecular Pathways: Targeting MYC-induced metabolic reprogramming and oncogenic stress in cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5835-41.

41. Pupo E, Avanzato D, Middonti E, Bussolino F, Lanzetti L. KRAS-Driven Metabolic Rewiring Reveals Novel Actionable Targets in Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:848.

42. Ma Q, Zhang W, Wu K, Shi L. The roles of KRAS in cancer metabolism, tumor microenvironment and clinical therapy. *Mol Cancer*. 2025;24(1):14.

43. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferrone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang Y, Fleming JB, Bardeesy N, Asara JM, Haigis MC, DePinho RA, Cantley LC, Kimmelman AC. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013 ;496(7443):101-5.

44. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):52.

45. Zhou Z, Li Y, Chen S, Xie Z, Du Y, Liu Y, Shi Y, Lin X, Zeng X, Zhao H, Chen G. GLUT1 promotes cell proliferation via binds and stabilizes phosphorylated EGFR in lung adenocarcinoma. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):303.

46. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018 Apr 2;128(4):1238-46.

47. Ortiz-Montero P, Londoño-Vallejo A, Vernot JP. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal*. 2017;15(1):17.

48. Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-

interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*. 2014;110(2):469-78.

49. Vitale I, et al. "Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the mechanisms and clinical relevance." *Cell Death & Differentiation*. 2023. PMID: 37100955

50. Takács-Vellai K. Apoptosis and Autophagy, Different Modes of Cell Death: How to Utilize Them to Fight Diseases? *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11609.

51. Capela E Silva F, Rodrigues CMP. Apoptosis-50 Years after Its Discovery. *Biomedicines*. 2023;11(4):1196.

52. Svandova E, Lesot H, Sharpe P, Matalova E. Making the head: Caspases in life and death. *Front Cell Dev Biol*. 2023;10:1075751.

53. Mosadegh M, Noori Goodarzi N, Erfani Y. A Comprehensive Insight into Apoptosis: Molecular Mechanisms, Signaling Pathways, and Modulating Therapeutics. *Cancer Invest*. 2025;43(1):33-58.

54. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams J, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018 ;25(3):486–541.

55. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-56. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4):a026716.

57. Gong Z, Jia Q, Guo J, Li C, Xu S, Jin Z, Chu H, Wan YY, Zhu B, Zhou Y. Caspase-8 contributes to an immuno-hot microenvironment by promoting phagocytosis via an ectocalreticulin-dependent mechanism. *Exp Hematol Oncol*. 2023;12(1):7.

58. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):621-32. doi: 10.1038/nrm2952

59. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90(3):405-13

60. Yanumula A, Cusick JK. Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. StatPearls Publishing; 2025 . Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560811/>.

61. Hrdinka M, Yabal M. Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease. *Genes Immun*. 2019 ;20(8):641-50.

62. Devi GR, Finetti P, Morse MA, Lee S, de Nonneville A, Van Laere S, Troy J, Geradts J, McCall S, Bertucci F. Expression of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) in Breast Cancer Is Associated with Shorter Survival and Resistance to Chemotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(11):2807.

63. Obexer P, Ausserlechner MJ. X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front Oncol*. 2014;4:197.

64. Green DR. The Death Receptor Pathway of Apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022;14(2):a041053.

65. Levoine N, Jean M, Legembre P. CD95 Structure, Aggregation and Cell Signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:314.

66. Artykov AA, Yagolovich AV, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP, Trushina DB, Gasparian ME. Death Receptors DR4 and DR5 Undergo Spontaneous and Ligand-Mediated

Endocytosis and Recycling Regardless of the Sensitivity of Cancer Cells to TRAIL. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 30;9:733688. doi: 10.3389/fcell.2021.733688. Erratum in: *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:820069.

67. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest.* 2001;108(7):957-62.

68. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000;407(6805):789-95.

69. Mahdizadeh SJ, Thomas M, Eriksson LA. Reconstruction of the Fas-Based Death-Inducing Signaling Complex (DISC) Using a Protein-Protein Docking Meta-Approach. *J Chem Inf Model.* 2021;61(7):3543-3558.

70. Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JW, Cain K, Macfarlane M. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell.* 2012 ;47(2):291-305.

71. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.* 2002 Jan 25;108(2):153-64. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00625-6. PMID: 11832206.

72. Vanamee ÉS, Faustman DL. TNFR2: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *Trends Mol Med.* 2017;23(11):1037-46.

73. Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:91.

74. Guerrache A, Micheau O. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand: Non-Apoptotic Signalling. *Cells.* 2024;13(6):521.

75. Allen JE, Ferrini R, Dicker DT, Batzer G, Chen E, Oltean DI, Lin B, Renshaw MW, Kretz-Rommel A, El-Deiry WS. Targeting TRAIL death receptor 4 with trivalent DR4 Atrimer complexes. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(10):2087-95.

76. Nguyen TT, Wei S, Nguyen TH, Jo Y, Zhang Y, Park W, Gariani K, Oh CM, Kim HH, Ha KT, Park KS, Park R, Lee IK, Shong M, Houtkooper RH, Ryu D. Mitochondria-associated programmed cell death as a therapeutic target for age-related disease. *Exp Mol Med.* 2023 ;55(8):1595-619.

77. 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 Nov 6;13(22):1838.

78. Watson SA, McStay GP. Functions of Cytochrome c oxidase Assembly Factors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7254.

79. Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, Okada H, Calzascia T, Jang Y, You-Ten A, Yeh WC, Ohashi P, Wang X, Mak TW. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell.* 2005;121(4):579-91.

80. Wu CC, Lee S, Malladi S, Chen MD, Mastrandrea NJ, Zhang Z, Bratton SB. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun.* 2016;7:13565.

81. Birkinshaw RW, Czabotar PE. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;72:152-62.

82. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010;37(3):299-310.
83. Roufayel R, Younes K, Al-Sabi A, Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life (Basel)*. 2022;12(2):256.
84. Todt F, Cakir Z, Reichenbach F, Emschermann F, Lauterwasser J, Kaiser A, Ichim G, Tait SW, Frank S, Langer HF, Edlich F. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J*. 2015;34(1):67-80.
85. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 2003;300(5616):135-9.
86. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018 ;285(3):416-31.
87. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.
88. Bano D, Prehn JHM. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*. 2018;30:29-37.
89. Benítez-Guzmán A, Arriaga-Pizano L, Morán J, Gutiérrez-Pabello JA. Endonuclease G takes part in AIF-mediated caspase-independent apoptosis in *Mycobacterium bovis*-infected bovine macrophages. *Vet Res*. 2018;49(1):69.
90. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol*. 2017;12:103-130.
91. Yan WT, Zhao WJ, Hu XM, Ban XX, Ning WY, Wan H, Zhang Q, Xiong K. PANoptosis-like cell death in ischemia/reperfusion injury of retinal neurons. *Neural Regen Res*. 2023;18(2):357-363.
92. Lin Y, Xiao J, Liu X, Ma X, Jiao C, Li P. [Research progress in mechanism of necroptosis in acute pancreatitis]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2022;34(3):329-32.
93. Zhang S, Tang MB, Luo HY, Shi CH, Xu YM. Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target. *Cell Death Dis*. 2017;8(6):e2905.
94. Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Robinson E, Fullerton J. *Rang & Dale's Pharmacology*. 10th ed. Elsevier – Health Sciences Division; 2023. ISBN 978-0-323-87395-6.
95. Janković SM. *Klinička farmakologija*. Kragujevac: Medicinski fakultet; 2012. ISBN 9788677600747.
96. Karges J, Stokes RW, Cohen SM. Metal Complexes for Therapeutic Applications. *Trends Chem*. 2021;3(7):523-34.
97. Schatzschneider U, Niesel J, Ott I, Gust R, Alborzina H, Wöfl S. Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with ruthenium(II) polypyridyl complexes [Ru(bpy)₂(N--N)]Cl₂ with N--N=bpy, phen, dpq, dppz, and dppn. *ChemMedChem*. 2008;3(7):1104-9.
98. Čanović P, Simović AR, Radisavljević S, Bratsos I, Demitri N, Mitrović M, Zelen I, Bugarčić ŽD. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem*. 2017 Oct;22(7):1007-1028. doi: 10.1007/s00775-017-1479-7. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28695374.

99. Skoczynska A, Lewinski A, Pokora M, Paneth P, Budzisz E. An Overview of the Potential Medicinal and Pharmaceutical Properties of Ru(II)/(III) Complexes. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(11):9512.
100. Ludwig G, Kaluđerović GN, Bette M, Block M, Paschke R, Steinborn D. Highly active neutral ruthenium(II) arene complexes: synthesis, characterization, and investigation of their anticancer properties. *J Inorg Biochem.*;113:77-82.
101. Tang H, Guo X, Yu W, Gao J, Zhu X, Huang Z, Ou W, Zhang H, Chen L, Chen J. Ruthenium(II) complexes as mitochondrial inhibitors of topoisomerase induced A549 cell apoptosis. *J Inorg Biochem.* 2023;246:112295.
102. Xu L, Zhang PP, Fang XQ, Liu Y, Wang JQ, Zhou HZ, Chen ST, Chao H. A ruthenium(II) complex containing a p-cresol group induces apoptosis in human cervical carcinoma cells through endoplasmic reticulum stress and reactive oxygen species production. *J Inorg Biochem.* 2019;191:126-34.
103. Tan C, Lai S, Wu S, Hu S, Zhou L, Chen Y, Wang M, Zhu Y, Lian W, Peng W, Ji L, Xu A. Nuclear permeable ruthenium(II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis. *J Med Chem.* 2010;53(21):7613-24.
104. Moreno-Alcántar G, Picchetti P, Casini A. Gold Complexes in Anticancer Therapy: From New Design Principles to Particle-Based Delivery Systems. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2023;62(22):e202218000.
105. Omata Y, Folan M, Shaw M, Messer RL, Lockwood PE, Hobbs D, Bouillaguet S, Sano H, Lewis JB, Wataha JC. Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). *Toxicol In Vitro.* 2006;20(6):882-90.
106. Che CM, Sun RW, Yu WY, Ko CB, Zhu N, Sun H. Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chem Commun (Camb).* 2003 ;(14):1718-9.
107. Sun RW, Li CK, Ma DL, Yan JJ, Lok CN, Leung CH, Zhu N, Che CM. Stable anticancer gold(III)-porphyrin complexes: effects of porphyrin structure. *Chemistry.* 2010;16(10):3097-113.
108. 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):1191-205.
109. 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.
110. Özerkan D, Ertik O, Kaya B, Kuruca SE, Yanardag R, Ülküseven B. Novel palladium (II) complexes with tetradentate thiosemicarbazones. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and xanthine oxidase inhibition. *Invest New Drugs.* 2019;37(6):1187-97.
111. Carneiro TJ, Martins AS, Marques MPM, Gil AM. Metabolic Aspects of Palladium(II) Potential Anti-Cancer Drugs. *Front Oncol.* 2020 Oct 12;10:590970. doi: 10.3389/fonc.2020.590970. PMID: 33154950; PMCID: PMC7586886.
112. Dilek E, Caglar S, Erdogan K, Caglar B, Sahin O. Synthesis and characterization of four novel palladium(II) and platinum(II) complexes with 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine, diclofenac

and mefenamic acid: In vitro effect of these complexes on human serum paraoxanase I activity. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018;32(4):e22043.

113. Bauer JA, Sysel AM, Dunphy MJ. Comparative Antitumor Efficacy and Toxicity Profile of SCC5, An Ag(I) N-Heterocyclic Carbene Complex, Relative to Platinum-based Chemotherapeutics. *Anticancer Res.* 2025 ;45(9):3629-37.

114. Li Y, Liu GF, Tan CP, Ji LN, Mao ZW. Antitumor properties and mechanisms of mitochondria-targeted Ag(I) and Au(I) complexes containing N-heterocyclic carbenes derived from cyclophanes. *Metallomics.* 2014;6(8):1460-8.

115. Marinković J, Jurišević M, Jovanović M, Milosavljević M, Jovanović I, Stević SJ, Vesović M, Nikolić M, Nedeljković N, Živanović A, Tomović D, Bukonjić A, Radić G, Gajović N. Silver(I) Complexes Bearing S-Alkyl Thiosalicylic Acid Derivatives: DNA/BSA Binding and Antitumor Activity In Vitro and In Vivo. *Pharmaceutics.* 2025;17(10):1340.

116. Raju SK, Karunakaran A, Kumar S, Sekar P, Murugesan M, Karthikeyan M. Silver Complexes as Anticancer Agents: A Perspective Review. *German Journal of Pharmaceuticals & Biomaterials.* 2022;1(1):6 28.

117. Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G. *Biohemija.* Beograd: Savremena administracija; 2003. ISBN 86-387-0696-0.

118. Čvorišćec D, Čepelak I, urednici. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. ISBN 978-953-176-443-8

119. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, Nikolac Gabaj N, Bach Rojecky L, i sur. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi.* 3. dopunjeno i obnovljeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2025. ISBN 978-953-368-162-7.

120. Boga S, Bouzada D, Lopez-Blanco R, Sarmiento A, Salvadó I, Alvar Gil D, Brea J, Loza MI, Barreiro-Piñeiro N, Martínez-Costas J, Mena S, Guirado G, Santoro A, Faller P, Vázquez ME, Vázquez López M. Copper(II) Cyclopeptides with High ROS-Mediated Cytotoxicity. *Bioconjug Chem.* 2025;36(3):500-9.

121. Alem MB, Damena T, Desalegn T, Koobotse M, Eswaramoorthy R, Ngwira KJ, Ombito JO, Zachariah M, Demissie TB. Cytotoxic mixed-ligand complexes of Cu(II): A combined experimental and computational study. *Front Chem.* 2022;10:1028957.

122. Molinaro C, Martoriati A, Pelinski L, Cailliau K. Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II. *Cancers.* 2020;12(10):2863. doi:10.3390/cancers12102863

123. Deng J, Yu P, Zhang Z, Wang J, Cai J, Wu N, Sun H, Liang H, Yang F. Designing anticancer copper(II) complexes by optimizing 2-pyridine-thiosemicarbazone ligands. *Eur J Med Chem.* 2018 Oct 5;158:442-452. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.09.020. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30241011..

124. Qin X Y, Wang Y N, Liu H F, Luo Z H, Zhang P L, Li F, Liu M R. 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.

125. Porchia, Marina, et al. "In Vitro Antitumor Activity of Water-Soluble Copper(I) Complexes with Diimine and Monodentate Phosphine Ligands." *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, 2020.

126. Komarnicka UK, Pucelik B, Wojtala D, Lesiów MK, Stochel G, Kyzioł A. Evaluation of anticancer activity in vitro of a stable copper(I) complex with phosphine-peptide conjugate. *Sci Rep.* 2021;11(1):23943.

127. Trávníček Z, Vančo J, Hošek J, Buchtík R, Dvořák Z. Cellular responses induced by Cu(II) quinolinonate complexes in human tumor and hepatic cells. *Chem Cent J*. 2012 ;6(1):160.
128. ROSENBERG B, VANCAMP L, KRIGAS T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature*. 1965;205:698-9.
129. Sherman SE, Gibson D, Wang AH, Lippard SJ. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))]. *Science*. 1985;230(4724):412-7.
130. Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctrl contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(3):F505-11.
131. Elmorsy EA, Saber S, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, El-Kott AF, AlShehri MA, Morsy K, Salama SA, Youssef ME. Advances in understanding cisplatin-induced toxicity: Molecular mechanisms and protective strategies. *Eur J Pharm Sci*. 2024 Dec 1;203:106939.
132. Mody H, Vaidya TR, Lesko LJ, Ait-Oudhia S. Pharmacodynamic Modeling to Evaluate the Impact of Cimetidine, an OCT2 Inhibitor, on the Anticancer Effects of Cisplatin. *Cells*. 2022;12(1):57.
133. Petruzzelli R, Polishchuk RS. Activity and Trafficking of Copper-Transporting ATPases in Tumor Development and Defense against Platinum-Based Drugs. *Cells*. 2019 ;8(9):1080.
134. Peklak-Scott C, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS. Role of glutathione S-transferase P1-1 in the cellular detoxification of cisplatin. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(10):3247-55.
135. Jansen BA, Brouwer J, Reedijk J. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J Inorg Biochem*. 2002;89(3-4):197-202.
136. Gold JM, Raja A. Cisplatin. [Updated 2023 May 22].
137. Filipiński KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH, Sparreboom A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86(4):396-402.
138. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, Vignat J, Ferlay J, Murphy N, Bray F. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2023;72(2):338-344.
139. Nikolić A, Mitrašinović P, Mićanović D, Grujičić S. Trends in morbidity and mortality of colorectal cancer in men and women of Central Serbia during the period 1999-2020. *Zdravstvena zaštita*. 2023;52(2).
140. Longo D, Fauci A, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 22nd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2025
141. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)*. 2024;16(8):1530.
142. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997;21(5):233-300.
143. Adeleke A, Adebayo AS, Agbaje K, Olajubutu O, Adesina SK. Colorectal Cancer: Therapeutic Approaches and Their Complications. *Biomedicines*. 2025;13(7):1646.
144. World Health Organization. Cervical cancer. WHO; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>.

145. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Global, regional, and national estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *Lancet Oncol.* 2021;22(8):1077-95.
146. Kesić V, Jovićević-Bekić A, Vujnović M. Cervical cancer screening in Serbia. *Coll Antropol.* 2007 ;31 Suppl 2:31-6.
147. Wu J, Jin Q, Zhang Y, Ji Y, Li J, Liu X, Duan H, Feng Z, Liu Y, Zhang Y, Lyu Z, Yang L, Huang Y. Global burden of cervical cancer: current estimates, temporal trend and future projections based on the GLOBOCAN 2022. *J Natl Cancer Cent.* 2025 ;5(3):322-29.
148. Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv.* 1992;12:197-217.
149. Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 ;23(10):1985-96.
150. Kanderi T, Munakomi S, Gupta V. Glioblastoma Multiforme. [Updated 2024 May 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.
151. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers (Basel).* 2022;14(10):2412.
152. Bralten LB, French PJ. Genetic alterations in glioma. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1129-40.
153. Li QJ, Cai JQ, Liu CY. Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma. *Chin Med J (Engl).* 2016;129(4):464-71.
154. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* 2009 ;100(12):2235-41.
155. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008 Jul 31;359(5):492–507.
156. Ilić RV. Prognostički faktori i savremeni terapijski pristup lečenju pacijenata obolelih od multiformnog glioblastoma [doctoral dissertation]. Belgrade: University of Belgrade, School of Medicine; 2017.
157. Zwinkels H, Dirven L, Bulbeck HJ, Grant R, Habets EJJ, Koekkoek JAF, Oberg I, Oliver K, Pace A, Rooney AG, Vos MJ, Taphoorn MJB. Identification of characteristics that determine behavioral and personality changes in adult glioma patients. *Neurooncol Pract.* 2021 Jul 6;8(5):550-558. doi: 10.1093/nop/npab041. PMID: 34594569; PMCID: PMC8475242.
158. Mason WP, Maestro RD, Eisenstat D, Forsyth P, Fulton D, Laperrière N, Macdonald D, Perry J, Thiessen B; Canadian GBM Recommendations Committee. Canadian recommendations for the treatment of glioblastoma multiforme. *Curr Oncol.* 2007;14(3):110-7.
159. Qin A, Musket A, Musich PR, Schweitzer JB, Xie Q. Receptor tyrosine kinases as druggable targets in glioblastoma: Do signaling pathways matter? *Neurooncol Adv.* 2021 ;3(1):vdab133.
160. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
161. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):74-88.
162. Wagner HP. Cell cycle control and cancer. *Indian J Pediatr.* 1998;65(6):805-14.

163. Firmino GS, de Souza MV, Pessoa C, Lourenco MC, Resende JA, Lessa JA. Synthesis and evaluation of copper(II) complexes with isoniazid-derived hydrazones as anticancer and antitubercular agents. *Biometals*. 2016 ;29(6):953-63.
164. Liu Z, Fan L, Niu D, Chen M, Zhang W, Liu Y, Xu J, Wang D. Copper (II) complex of salicylate phenanthroline induces the apoptosis of colorectal cancer cells, including oxaliplatin-resistant cells. *Oncol Rep*. 2023;50(3):170.
165. Naveen P., Jain R., Kalaivani P., Shankar R., Dallemer F., Prabhakaran R. „Unpredicted formation of copper(II) complexes containing 2-thiophen-2-yl-1-thiophen-2-ylmethyl-1H-benzoimidazole and their most promising in vitro cytotoxicity in MCF-7 and hela cell lines over cisplatin“, *New Journal of Chemistry*, 2017, 41: 8885–98.
166. Barilli A, Atzeri C, Bassanetti I, Ingoglia F, Dall'Asta V, Bussolati O, et al. Oxidative stress induced by copper and iron complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives causes paraptotic death of HeLa cancer cells. *Mol Pharm*. 2014;11(4):1151–63.
- 167- Zhang L, Fu C, Li J, Zhao Z, Hou Y, Zhou W, Fu A. Discovery of a Ruthenium Complex for the Theranosis of Glioma through Targeting the Mitochondrial DNA with Bioinformatic Methods. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4643.
168. Almeida CM, Nascimento ÉCM, Martins JBL, da Mota THA, de Oliveira DM, Gatto CC. Crystal Design, Antitumor Activity and Molecular Docking of Novel Palladium(II) and Gold(III) Complexes with a Thiosemicarbazone Ligand. *Int J Mol Sci*. 2023 ;24(14):11442.
169. Dimitrijević M, Žižić M, Jelača S, Maksimović-Ivanić D, Sanchez DF, Grolimund D, Mroginski MA, Spasojević I. Interaction studies of biliverdin-Cu complex formation using XANES, XRF, and DFT analyses and its effect on cytotoxicity in glioblastoma cell line (U251). *Arch Biochem Biophys*. 2025 ;770:110466.
170. Ng CH, Kong SM, Tiong YL, Maah MJ, Sukram N, Ahmad M, Khoo AS. Selective anticancer copper(II)-mixed ligand complexes: targeting of ROS and proteasomes. *Metallomics*. 2014;6(4):892-906.
171. Mahendiran D, Amuthakala S, Bhuvanesh NSP, Kumar RS, Rahiman AK. Copper complexes as prospective anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation, selective targeting of cancer cells by DNA damage and S phase arrest. *RSC Adv*. 2018;8(30):16973-16990.
172. Rezaei A, Khanamani Falahati-Pour S, Mohammadzadeh 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):2877-84.
173. Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Amir S, Husain FM, Alsalme A, Siddiqui MA, AlKhedhairy AA, Khan RA. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. *Sci Rep*. 2019;9(1):5237.
174. de Medeiros WMTQ, de Medeiros MJC, Carvalho EM, de Lima JA, da S Oliveira V, de B Pontes ACF, da Silva FON, Ellena JA, de O Rocha HA, de Sousa EHS, de L Pontes D. A vanillin-based copper(ii) metal complex with a DNA-mediated apoptotic activity. *RSC Adv*. 2018;8(30):16873-86.
175. O'Sullivan E, O'Shea D, Devereux M, Howe O. Apoptotic cell death induced by copper (II), manganese (II) and silver (I) complexes containing bridging dicarboxylate and 1,10-phenanthroline ligands: one of the multi-modes of anticancer activity? *Biometals*. 2025 Jun;38(3):785-805. doi: 10.1007/s10534-025-00676-8. Epub 2025 Mar 17. PMID: 40095185; PMCID: PMC12119673.
176. Arikrishnan S, Loh JS, Teo XW, Bin Norizan F, Low ML, Lee SH, Foo JB, Tor YS. Ternary Copper (II) Complex Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Colorectal Cancer

Cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2022;22(5):999-1011. doi: 10.2174/1871520621666210708100019. PMID: 34238173.

177. Li DD, Yagüe E, Wang LY, Dai LL, Yang ZB, Zhi S, Zhang N, Zhao XM, Hu YH. Novel Copper Complexes That Inhibit the Proteasome and Trigger Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *ACS Med Chem Lett.* 2019;10(9):1328-1335.

178. Yang Y, Guo FF, Chen CF, Li YL, Liang H, Chen ZF. Antitumor activity of synthetic three copper(II) complexes with terpyridine ligands. *J Inorg Biochem.* 2023 Mar;240:112093. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.112093. Epub 2022 Dec 6. PMID: 36525715.

БИОГРАФИЈА

Саша Бабић, рођен 26.августа 1977.године у Крагујевцу. Основно образовање завршио је у родном граду, а затим и средњу Медицинску школу Сестре Нинковић. Након завршетка средње школе 1996.године уписао Медицински факултет, Универзитета у Крагујевцу и на истом дипломирао 12.маја 2003.године и тиме стекао звање доктор медицине. Након спроведеног стажа и положеног стручног испита 03.септембра 2004.године одлази у Школу Резервних Официра Санитетске Службе на Војно медицинској академији где стиче звање попоручника у резерви. Период од октобра 2007.године до септембра 2009.године волонтира на Клиници за психијатрију Универзитетског Клиничког Центра Крагујевац, када у септембру наведене године добија статус клиничког лекара а затим специјализацију психијатрије у јуну 2012.године. Докторске академске студије уписује 2009.године а усмени докторски испит положио 30.јануара 2020.године. Затим стиче звање лекара специјалисте психијатрије 29.маја 2018.године. актуелно врши функцију начелника одељења за психотичне поремећаје на Клиници за психијатрију Универзитетског Клиничког Центра Крагујевац од 2024.године. Током рада на Клиници за психијатрију Универзитетског Клиничког Центра Крагујевац активно учествовао на многим домаћим и страним пројектима Јачања менталног здравља у Републици Србији. Активно и пасивно учествовао на многим предавањима, као и скуповима са међународним учешћем. Члан је Лекарске коморе Србије, Српског лекарског друштва, Удружења психијатара Србије.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

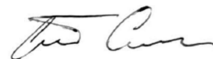
Антитуморски ефекат бакар(II) комплекса са азот-кисеоничним донорским лигандима на хелије мултиформног глиобластома in vitro

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, 22.01.2026 године,



потпис аутора

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

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
*Антитуморски ефекат бакар(II) комплекса са азот-кисеоничним донорским
лигандима на хелије мултиформног глиобластома in vitro*
истоветне.

У 12 РДГЈ>ЕВЦУ, 22.01.2026 године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Саша Бабић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Антитуморски ефекат бакар(II) комплекса са азот-кисеоничним донорским лигандима на хелије мултиформног глиобластома in vitro

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у КРАЉСКОЈ, 22.01.2026. године,



потпис аутора

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