



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ана М. Поповић

**Карактеризација и испитивање антитуморске активности
комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима
тиосалицилне киселине**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ, 2020.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Ana M. Popović

**Characterization and testing of antitumor activity of zinc(II)
complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid**

Doctoral Dissertation

KRAGUJEVAC, 2020.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Ана Поповић
Датум и место рођења: 02.09.1979., Подгорица
Садашње запослење: Општа Болница Никшић, дерматовенеролог
Докторска дисертација
Наслов: Карактеризација и испитивање антитуморске активности комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине
Број страница: 86
Број слика: 26 (графикона 20, табела 6)
Број библиографских података: 181
Установа и место гдје је рад израђен: Факултет медицинских наука у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија, Онкологија
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 16.03.2018.
Број одлуке и датум прихватања теме: IV-03-449/12 од 06.06.2018. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан 3. проф. др Гордана Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан
Комисија за оцјену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Проф. др Гордана Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан 3. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан
Датум одбране дисертације:

Doctoral dissertation identification page

Author
Name and surname: Ana Popović
Date and place of birth: 02.09.1979., Podgorica
Current employment: General Hospital Nikšić, dermatovenerologist
Doctoral Dissertation
Title: Characterization and testing of antitumor activity of zinc(II) complexes with some S-alkenyl derivates of thiosalicylic acid
No. of pages: 86
No. of images: 26 (charts 20, tables 6)
No. of bibliographic data: 181
Institution and place of work: Faculty of medical sciences Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine
Mentor: MD PhD Ivan Jovanovic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific fields of Microbiology and immunology, Oncology
Assessment and defense
Topic application date: 16.03.2018.
Decision number and date of acceptance of the doctoral topic: IV-03-449/12 од 06.06.2018.
Commission for the evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none">1. Marija Milovanović, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, president2. Danilo Vojvodić, MD PhD, full professor at the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrower scientific field of Immunology, member3. Gordana Radić, PhD, Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pharmaceutical chemistry, member
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation: <ol style="list-style-type: none">1. Marija Milovanović, MD PhD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, president2. Gordana Radić, PhD, Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pharmaceutical chemistry, member3. Danilo Vojvodić, MD PhD, full professor at the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrower scientific field of Immunology, member
Date of defense of the dissertation:

Абстракт:

Два комплекса цинка(II) и S-алкенил деривата тиосалицилне киселине (енгл. *S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid- SADTA*) (лиганди) су синтетисани и карактерисани на основу резултата елементалне микроанализе, IR, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије. Комплекси су добијени директном реакцијом ZnCl_2 и SADTA, у воденом раствору. Према физичко-хемијским и спектроскопским подацима, закључујемо да су лиганди бидентатно координовани за јон цинка(II). Интеракција комплекса са DNA говеђег тимуса (CT-DNA) испитивана је Uv-vis и флуориметријском методом. Цитотоксична активност комплекса поређена је са оксалиплатином и цисплатином и анализирана је на двије различите туморске ћелијске линије: мишји карцином дебелог цријева (CT26) и мишји меланом (B16F1), док су не-туморске мишје мезенхимске матичне ћелије (mmMSCs) коришћене као контрола. Оба комплекса показала су умјерену активност против ћелија мишјег рака дебелог цријева и меланома. Смањење вијабилности ћелија меланома је изазвано задржавањем ћелије у G2 фази ћелијског циклуса и апоптозом. Цинк(II) комплекс са SADTA, иако има значајно слабији цитотоксични ефекат на туморске ћелије него оксалиплатина и цисплатина, дјелује селективније на туморске ћелије од познатих љекова.

Кључне речи:

Комплекси цинка(II), S-алкенил деривати тиосалицилне киселине, карактеризација, антитуморска активност

Abstract:

In this study, we generated and analyzed two complexes of zinc (II) and S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid- SADTA (ligands), by microanalysis, IR, H and C NMR spectroscopy. Synthesis of the complexes was accomplished by direct contact of $ZnCl_2$ and SADTA. Physico-chemical as well as spectroscopic analysis revealed bidentately coordination of the ligands to the zinc(II) center. Absorption as well as ethidium bromide displacement analyses were used for CT-DNA test. Cytotoxicity of the complexes was tested in colon carcinoma (CT26) and melanoma (B16F1), as well as in mesenchymal stem cells (mMSCs), all derived from mouse. Cytotoxicity of complexes was compared with oxaliplatin and cisplatin.

We revealed moderate cytotoxicity of complexes against tumor cells. This phenomenon was accompanied by induction of apoptosis and G2 phase arrest. The tested zinc (II) complexes has a weaker cytotoxicity than oxaliplatin and cisplatin. However, they show a much more selective effect on tumors than known drugs.

Key words:

Zinc (II) complexes, S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, characterization, antitumor activity

Мом сину Лазару на безграничној љубави и подршци!!!

Захвалница

Посебну захвалност бих хтјела да искажем мом ментору, проф др Ивану Јовановићу, на несебичним савјетима и искреној подршци која ме пратила кроз све фазе рада моје докторске дисертације.

Затим, велику захвалност дугујем и проф. др Небојши Арсенијевићу, на стручним сугестијама које су унаприједиле овај рад.

Још једно велико хвала проф. др Марији Миловановић, проф. Гордани Радић и доц. Милени Јуришевић на огромном труду и посвећености, због њихове удружене несебичне помоћи увијек сам знала да идем у правом смјеру.

И на крају још једно хвала дугујем свом оцу, проф. др Митру Вујошевићу који ми је био основни мотив и покретач да истрајем на овом путу.

САДРЖАЈ

1. Увод.....	1
1.1. Цинк.....	1
1.1.1. Посљедице недостатка цинка	2
1.1.2. Посљедице прекомјерне концентрације цинка	3
1.1.3. Координовање цинка у комплексним једињењима	3
1.1.4. Антитуморска активност цинка	3
1.1.5. Тиосалицилна киселина.....	4
1.1.6. Координована једињења тиосалицилне киселине	5
1.1.7. Комплекси цинка (II) са тиосалицилном киселином као лигандом	6
1.2. Ћелијски циклус.....	7
1.3. Контрола ћелијског циклуса	7
1.3.1. Контрола исправности одвијања ћелијског циклуса: рестрикционе и контролне тачке	10
1.3.2. Ћелијски циклус и тумори.....	11
1.3.3. Протеини контролних тачака.....	13
1.3.4. Инхибитори циклин зависних киназа у развоју антиантитуморских љекова	13
1.4. Ћелијска смрт.....	14
1.4.1. Апоптоза	14
1.4.2. Морфологија апоптозе	14
1.4.3. Некроза. Апоптоза vs. некроза	15
1.4.4. Механизми апоптозе.....	16
1.4.5. Спољашњи пут апоптозе	16
1.4.6. Перфорин/гранзимски пут апоптозе	17
1.4.7. Унутрашњи пут апоптозе.....	17
1.4.8. Егзекуторски пут апоптозе	19
1.4.9. Физиолошка апоптоза	19
1.4.10. Патолошка апоптоза.....	20
1.4.11. Други облици ћелијске смрти.....	22
1.4.12. Аутофагија	23
1.4.13. Атипичне ћелијске смрти	25
2. Циљ истраживања	27

3. Материјал и методе	28
3.1. Продукција лиганда	28
3.2. Поступак продукције комплекса	28
3.2.1. Продукција комплекса цинка(II) и SADTA, [Zn(S- propenyl -thiosal) ₂] (C1)	28
3.2.2. Продукција комплекса цинка(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, [Zn(S-isobutenyl-thiosal) ₄] (C2)	28
3.3. Анализе и мјерења	29
3.3.1. Елементална микроанализа	29
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија	29
3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија	29
3.3.4. Спектроскопске студије апсорпције	29
3.3.5. Флуоресцентна мјерења	29
3.3.6. Припрема раствора испитиваних комплекса	29
3.4. Ћелијске културе	30
3.5. МТТ тест	30
3.6. Испитивање доминантног типа ћелијске смрти проточном цитометријом	31
3.7. Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом	32
3.8. Статистичка анализа	32
4. Резултати	33
4.1. Синтеза и карактеризација ново синтетисаних комплекса Zn(II)	33
4.2. Спектроскопске студије апсорпције	37
4.3. Биолошка активност комплекса цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине	43
4.3.1. Цитотоксични ефекти комплекса цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине	43
4.4. Утицај комплекса цинка(II) са SADTA на апоптозу туморских ћелија	52
4.5. Комплекси цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине индукују застој ћелијског циклуса у G2 фази	54
5. ДИСКУСИЈА	56
5.1. Хемијска карактеризација	57
5.2. Интеракција комплекса цинк (II) са SADTA и DNA	58
5.3. Испитивање <i>in vitro</i> антиканцерског ефекта комплекса цинка(II) са SADTA	58
5.4. Анализа апоптозе туморских ћелија након третмана комплекса цинка(II) са SADTA	61

5.5. Анализа ћелијског циклуса туморских ћелија након третмана комплекса цинка(II) са SADTA	62
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	64
7. СКРАЋЕНИЦЕ	65
8. ЛИТЕРАТУРА	66

1. Увод

Предмет овог рада био је припремити два нова комплекса цинка (II) и S-алкенил деривата тиосалицилне киселине (енгл. *S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid- SADTA*), окарактерисати их и анализиранти цитотоксични потенцијал ових комплекса. У уводном дијелу, приказали смо карактеристике цинка, тиосалицилне киселине и комплексних једињења, као и механизме регулације ћелијског циклуса и ћелијске смрти.

1.1. Цинк

Поред гвожђа, цинк је други најзаступљенији метал D-блока у људском тијелу. Цинк се појављује као Zn (II) јон који је електрон дефицијентан и функционише као Левисова киселина (1, 2). У биолошким системима, јони цинка се често налазе на активном дијеловима ензима, а такође могу бити битни за стабилизацију протеинских структура. Суштина есенције цинка установљена је 1869. године за биљке, 1934. за експерименталне животиње, а 1961. за људе. (3) Синдром анемије, хипогонадизма и патуљастости је забиљежен код 21-годишњег иранског фармера 1961. године који је живио на исхрани нерафинисаним хљебом, кромпиром и млијеком (4). Убрзо након тога, сличан синдром је примијећен код египатских адолесцената који су имали сличну историју исхране као и Иранци, углавном на хљебу и пасуљу (5). Давање додатног цинка или дијета која садржи адекватне животињске протеинске намирнице побољшало, је раст и кориговало хипогонадизам, док је анемија коригована пероралним узимањем гвожђа. Касније студије су показале да је синдром примарно резултат ниског уноса цинка у исхрани. Од открића недостатка цинка као здравственог проблема људи 1961. године, (3) интересовање за биохемијске и клиничке аспекте исхране цинком значајно се повећало.

Биохемијске и физиолошке функције цинка

Иако су биохемијски механизми зависни од цинка у физиолошким функцијама опсежно проучавани, нису установљени јасни односи. Цинк је свеприсутан у ћелијама за разлику од гвожђа, које је садржано у дефинисаним ћелијским компонентама и има дефинисану физиолошку улогу. Улога цинка у биологији може се груписати у три опште функционалне класе: каталитичка, структурна и регулаторна функција (6).

Хомеостаза цинка

Одржавање константног нивоа ћелијског цинка, или хомеостазе, је неопходно за преживљавање. Код животиња и људи, прилагођавање укупне апсорпције цинка и ендogene интестиналне екскреције је примарно средство за одржавање хомеостазе цинка (7). Прилагођавање апсорпције цинка у гастроинтестиналном тракту и ендогена екскреција су синергистичке. Чини се да се промјене у ендогеном излучивању брзо дешавају за промјенама у уносу непосредно изнад или испод оптималног уноса, док апсорпција цинка

реагује спорије, али има капацитет да се носи са великим флукуацијама у уносу (8). Са екстремно ниским уносом цинка или са продуженим граничним уносом, секундарна хомеостатска прилагођавања могу појачати гастроинтестиналне промјене. Ово секундарно прилагођавање обухвата промјене у излучивању цинка урином, промјену брзине циркулације цинка у плазми и евентуално задржавање ослобађања цинка из ткива (9, 10).

1.1.1. Посљедице недостатка цинка

Због мноштва основних биохемијских функција цинка у ћелијама, постоји широк спектар физиолошких знакова недостатка цинка. Ови знаци варирају у зависности од озбиљности стања. Органски системи за које се зна да су клинички погођени недостатком цинка укључују епидермални, гастроинтестинални, централни нервни, имунски, скелетни и репродуктивни систем (11).

Клинички знаци тешког недостатка цинка идентификовани су у индустријализованим земљама, нарочито код особа које пате од *acrodermatitis enteropathica*, ријетког генетског поремећаја који посебно утиче на апсорпцију цинка (12). Тешки недостатак цинка који је резултат других узрока, као што је продужена парентерална исхрана са неадекватним садржајем цинка, довела је до сличних клиничких знакова као код *acrodermatitis enteropathica* (13).

Мада је клинички мање изражен, блажи недостатак цинка је много чешћи. Функционална оштећења идентификована у испитивањима могу бити карактеристична и за благи и умјерени недостатак цинка.

Раст и развој

Једна од најистраженијих клиничких карактеристика везаних за недостатак цинка је оштећење физичког раста и развоја. (14, 15). Механизми који су укључени, међутим, нису добро схваћени. Овај ефекат је најзначајнији током периода брзог раста као што су трудноћа, дјетињство и пубертет током којих су потребе за цинком највеће (10).

Ризик од инфекција

Дијареја. Пролив је карактеристично, мада не и обавезно, обиљежје *acrodermatitis enteropathica* (16). Могућа објашњења за повезаност недостатка цинка и дијареје укључују оштећење имунског система и транспорт ћелија цријевне мукозе (17). Узрочна веза између недостатка цинка и дијареје је показана благотворним ефектима додавања цинка и истовременим повећањем брзине раста (18).

Пнеумонија. Студије суплементације цинка код дјеце показале су статистички значајно смањење преваленције пнеумоније у земљама у развоју (19).

Маларија. Неизвјесно је у којој мјери орално додавање цинка може да смањи епизоде маларије у ендемским подручјима. Према неким истраживањима, изгледа да је маларија атенуисана додатком цинка (20). Међутим, постоје студије које не показују ефекат

суплементације цинка против маларије (21). Потребне су даље студије како би се утврдио овај ефекат.

1.1.2. Посљедице прекомјерне концентрације цинка

Типични симптоми токсичности цинка укључују мучнину, повраћање, дијареју и грчеве.

1.1.3. Координовање цинка у комплексним једињењима

Хемијске особине цинка чине га идеалним металом за проучавање улоге координационог соја у повећању ензимске брзине. Цинк-јонски и протеински остаци који су директно повезани са цинковим јоном представљају функционални диполни комплекс, а поларизација овог комплекса, која се преводи у координациону дисторзију, може подесити електрофилност, а тиме и реактивност. Конзервирани протеински остаци изван комплекса дипола, као што су остаци другог омотача, могу играти улогу у подржавању електрона. Да би се тестирала корелација између поларитета дипола и афинитета везивања лиганда, спроведено је испитивање структурне функције ди-цинк аминокиселиназе поријеклом из *Vibrio proteolyticus* (22). Аланинска супституција S228 и M180 резултује каталитичким смањењем ензимима чије кристалне структуре показују веома малу промјену у положајима металних јона и протеинских остатака. Међутим, детаљније испитивање кристалних структура показује мале позиционе промјене које објашњавају разлике у геометрији координације цинковог јона. Мјерења афинитета везивања леуцин фосфонске киселине, аналога транзиционог стања и леуцина, производа, показују корелацију између координационе геометрије и афинитета везивања лиганда. Ови резултати указују на то да координациони број и поларитет могу подесити електрофилност цинка (22).

Карбонска анхидраза, карбоксипептидаза и супероксид дисмутаза су неки од примјера добро проучених ензима цинка (23, 24).

1.1.4. Антитуморска активност цинка

Веза између недостатка цинка и тумора је добро позната (25, 26). До данас је анализиран велики број семикарбазон- и тиосемикарбазон- комплекса цинка (II) са антитуморском активношћу (27-29). Цинк (II) комплекси са Schiff базама такође могу бити биолошки активни и показати побољшање активности у односу на слободне пролиганде (30).

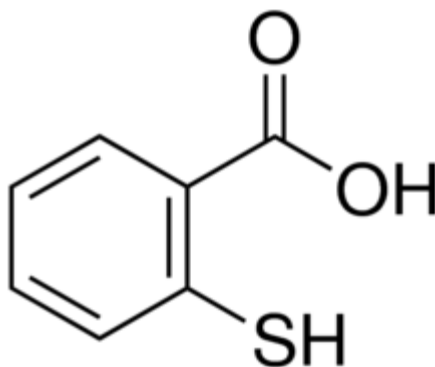
Познато је да је цинк есенцијална компонента за DNA везујуће протеине са Zn остацима, као као и Cu/Zn супероксид дисмутаза (енгл. superoxide dismutase- SOD) и разни протеини укључени у оштећење и поправку DNA (31,32). Zn је такође значајан за ћелијску пролиферацију, регулацију ћелијског циклуса, диференцијацију и апоптозу (33). Други, антиоксидативни и анти-канцерогени механизми повезани са хомеостазом Zn играју инхибиторну улогу у неопластичном расту ћелија. Одавно је познато да цинк (II) јон инхибира апоптозу.

У једињењима цинка као што су водени раствори цинк нитрата и цинк сулфата, Zn^{2+} јон је стабилан у електролитском раствору присутног слободног јона $Zn(II)$, који реагује са ћелијом. У случају као што је површина кристалита ZnO , ослобођен Zn^{2+} јон присутан је као слободни цинков јон. Дакле, ови јони цинка утичу на главну фазу процеса иницијације, промоције, прогресије, и метастазирања тумора. С обзиром на важност ових канала и сигналних путева у ћелијској пролиферацији, миграцији и метастазирању, испитивање утицаја недостатка Zn на функције ових канала у ћелијама тумора је приоритет (34).

Према физиологији и патологији јона Zn^{2+} (35), дисрегулација $Zn(II)$, недостатак и прекомјерна концентрација су повезани са разним болестима, синтезом DNA , неуротрансмисијом, и апоптозом, посебно у туморима. У 98% људског тијела $Zn(II)$ је локализован интрацелуларно, гдје је цинк (II) везан ниским афинитетом са металотионеином (енгл. Metallothionein- MT). MT штити ћелије од оксидативног стреса, јер сарађује са редукованим глутатионом (енгл. reduced glutathione- GSH). MT заједно са цинком (II) утиче на апоптозу и пролиферацију, код којих је повишен серумски ниво MT у бројним малигнитетима, између осталих у туморима дојке и простате. Антибактеријска активност јона цинка (II) је веома велика, нарочито против Грам-позитивних и негативних бактерија (36, 37). Антитуморска активност јона Zn^{2+} против канцера и туморских ћелија је у фази интензивног испитивања. Антиканцерогене активности јонског раствора цинка (II) испитиване су у циљу превенције рака, настајања и раста тумора, пролиферације, инвазије, и метастазирања, у којима је системски ефекат јона цинка (II) укључен у статус хомеостазе цинка, регулација апоптозе у малигној ћелији, пролиферацији ћелија тумора и расту, и ангиогенезу у туморским ћелијама.

1.1.5. Тиосалицилна киселина

Тиосалицилна киселина је органосумпорно једињење које садржи карбоксилне и сулфхидрилне функционалне групе. Њена молекуларна формула је $C_6H_4(SH)(CO_2H)$. То је жута чврста супстанца која је слабо растворљива у води, етанолу и диетил етру и алканима, али је више растворљива у $DMSO$.

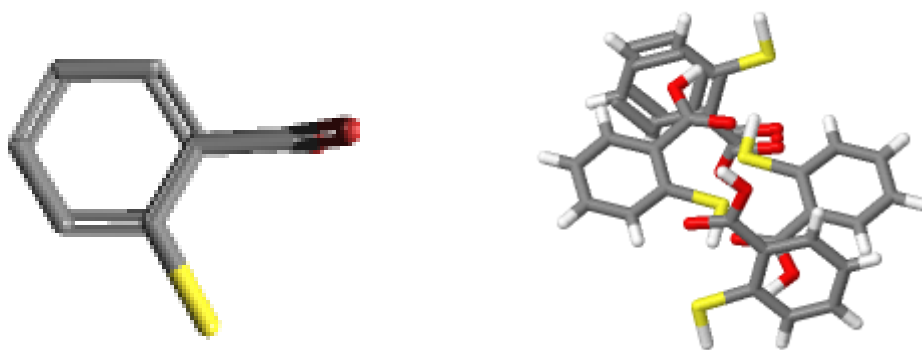


Фигура 1. Структурна формула тиосалицилне киселине

1.1.6. Координована једињења тиосалицилне киселине

Хибрид лиганди који садрже комбинацију „меког сумпора“ и „чврстих атома“ донора кисеоника су од великог интереса за координациону хемију. Ова комбинација донорских група се прилагођава разноврсним металним јонима који обухватају читав периодни систем. Док је координациона хемија таквих лиганата у живи интересовања последњих неколико година, у областима као што је хемија материјала све више се користи њихова хетеродифункционална природа као средство за спајање различитих материјала.

Меркаптобензоичне киселине су од посебног интереса у овој класи хибридних лиганда због њихове доступности и стабилности, у комбинацији са њиховом богатом координационом хемијом (38). Лиганди изведени из тиосалицилне киселине (депротонизацијом једног или оба кисела водоника) је су у стању да се координирају са широким спектром метала, преко једног или оба тиолат-сумпора и карбоксилата у различитим облицима везивања, укључујући монодентат, хелат и низ повезујућих модова. Због геометријских ограничења ови лиганди не учествују у хелацији метала, међутим овај „недостатак“ се замјењује формирањем значајаног броја супрамолекуларних структура у координационим комплексима 3МВА и 4МВА гдје је лиганд S-везан за један или више метала, а затим за слободну COOH групу и учествује у интеракцијама везивања водоника. Добро је познато да карбоксилне киселине формирају водоничне димере у чврстом стању (39, 40). Као резултат, карбоксилна група је стабилно успостављена са разноврсном функционалношћу у супрамолекуларној хемији и широк спектар мреже водоничних веза је описан на основу координационих једињења (41-43), као и органометалних једињења (44-47).



Фигура 2. 3D и кристална структура тиосалицилне киселине
(извор: PubChem URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

1.1.7. Комплекси цинка (II) са тиосалицилатном киселином као лигандом

Координациона хемија Zn (II) са тиосалицилатним лигандима је испитивана, али комплекси типично нису детаљно описани (48). Комплекси цинка су испитивани под претпоставком да биоесенцијални комплекси метала са биолошки активним лигандима могу бити мање токсични за нормалне ћелије у односу на туморске. У претходним истраживањима (49), синтетисани су и карактерисани неки комплекси Zn (II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине. Испитивана је и цитотоксичка активност комплекса бакра (II) са лигандима који су хемијски најсличнији лигандима од интереса у овој докторској дисертацији. Тестови цитотоксичности су показали да и тиосалицилатни прекурсори и њихови комплекси имају цитотоксичну активност против HCT- 116 ћелија хуманог карцинома колоне (50). У покушају да се побољша биолошка активност претходно синтетизованих комплекса бакра (II), испитивани су одговарајући комплекси цинка (II) са незасићеним тиосалицилатним лигандима и тестирана њихова цитотоксична активност.

1.2. Ћелијски циклус

Alma Howard и Stephen Pelc су 1951. године описали фазну и цикличну природу ћелијске диобе (56). Овај јединствени процес данас знамо као ћелијски циклус. Два догађаја су у функционалном смислу основа овог циклуса- то су синтеза DNA (фаза синтезе или фаза S) и непосредна подела ћелије (фаза M). Овим двама фазама претходе фазе раста и реорганизовања, односно фазе G1 и G2. Ћелијски циклус је строго регулисан и контролисан процес односно обједињен и целовит програм који подељен у неколико узастопних поменутих фаза (61).

Суштна диобе ћелије је процес током кога ћелија пролази кроз репликацију своје DNA и расподела репликованих хромозома у двије одвојене индентичне ћелије. Иако је овај процес познат као митоза (фаза M), она је заправо само једна од фаза ћелијског циклуса (61). Митоза подразумева процес диобе ћелије и састоји се од: профазе (распад нуклеолуса и нуклеарне мембране, појава вретенастих влакана), прометафазе (причвршћивање вретенастих влакана за хромозоме и кондентација), метафазе (поравнање хромозома), анафазе (подела центромере, удаљавање хроматида), телофазе (декондензација хромозома, ишчезавање вретенастих влакана). Ћелијски циклус се окончава цитокинезом, тј. диобом цитоплазме што коначно омогућује формирање ћелија ћерки (61). Као што су и Norbury С и сарадници потврдили, стадијуми ћелијског циклуса између двије митозе укључују фазе: G1, S и G2 (51). Током фазе G1 (енгл. *Gap*) ћелија се физички повећава, умножава своје органеле и прави молекулске градивне блокове који ће јој бити потребни у каснијим фазама циклуса. У следећој фази- S, ћелија у свом једру синтетише комплетну копију DNA. Посматрано *in vitro*, током култивација различитих ћелија сисара, синтеза DNA обично траје 6-8 сати. Ова фаза током које се синтетише DNA названа је фаза S (енгл: *Syntetic*) и њено трајање је одређено огромном количином ћелијске DNA који се морају верно репликовати (61). Током фазе G2 ћелија нараста, ствара протеине и органеле и почиње да реорганизује свој цитоскелет у припреми за митозу. Након завршетка циклуса, ћелија или поново започиње процес или напушта циклус улазећи у фазу G0 (стање мировања) током које се може одиграти терминална диференцијација.

1.3. Контрола ћелијског циклуса

Циклин-зависне киназе (енгл. *Cyclin-dependent kinase- CDKs*)

Резултати анализе ћелијског циклуса различитих еукариотских ћелија показали су да напредовање ћелије кроз ћелијски циклус покрећу активација и инактивација ензима названих циклин-зависне киназе (CDKs), што покреће или спречава прелазак у следећу фазу циклуса. CDK су мале серин/треонин протеин киназе за чију активност је потребна повезаност са циклином. Једна CDK остварује везу са различитим циклинама и тако фацилитира напредовање ћелије кроз фазе G1, S, G2 и M. Познато је девет различитих CDK, а пет је активних током ћелијског циклуса и то су:

- CDK4, CDK6 и CDK2 у G1
- CDK2 у S
- CDK1 у G2 и M

Везивање са циклином омогућава неактивној CDK да пређе у активну конфигурацију сличну мономерним и активним киназама те да активирају нисходне сигналне путеве у ћелији (52). Док CDK7 дјелује у комбинацији са циклином H, а остале осим набројаних CDK не играју значајну улогу у регулацији пролиферације (55, 56). Нивои циклина флукутирају током ћелијског циклуса, у зависности од спољашњих и унутрашњих сигнала (53). Након преласка у слиједећу фазу ћелијског циклуса, циклини који су били активни у претходној фази се деградирају.

Нобелове награде за открића повезана са регулацијом ћелијског циклуса

2001. Контрола ћелијског циклуса

Leland Hartvel (рођен 1939.), Fred Hutchinson Cancer Research Center, Сијетл, САД, награђен је за откриће посебне групе гена који контролишу ћелијски циклус. Један од ових гена назван „старт“ игра централну улогу у контроли првог корака сваког ћелијског циклуса. Хартвел је такође представио концепт „контролне тачке“ и његов рад је омогућио боље разумијевање ћелијског циклуса.

Paul Nurse (рођен 1949.), Imperial Cancer Research Fund, Лондон, је идентификовао, клонирао и генетским и молекуларним методама окарактерисао један од кључних регулатора ћелијског циклуса, CDK (циклин зависну киназу). Он је показао да је функција CDK високо конзервирана током еволуције. CDK „води“ ћелију кроз ћелијски циклус хемијским модификацијама (фосфорилацијом) других протеина.

Timothi Hunt (рођен 1943), Imperial Cancer Research Fund, Лондон, награђен је за откриће циклина, протеина који регулишу функцију CDK. Он је показао да се циклини периодично деградирају током сваке ћелијске диобе, и механизам за који се показало да је од општег значаја за контролу ћелијског циклуса.

1989. Ћелијско поријекло ретровирусних онкогена

Michael Bishop и **Harold Varmus** користили су онкогене ретровирусе да би идентификовали онкогене који контролишу раст у нормалним ћелијама. Године 1976. објавили су изванредан закључак да онкоген у вирусу не представља прави вирусни ген, већ је био нормалан ћелијски ген, који је вирус стекао током репликације у ћелији домаћину и затим понио са собом кад се ослободио из ћелије.

Неопходна је чврста веза циклина и одговарајуће CDK да би регулисали ћелијски циклус. Да би био потпуно активан, CDK/циклински комплекс мора да буде фосфорилисан на одређеним мјестима. Ова фосфорилација активира протеин мијењајући му облик. Протеини које фосфорише CDK су укључени у напредовање ћелије до слиједеће фазе (53, 54). И док је концентрација CDK релативно стабилна током цијелог циклуса, ниво циклина се мијења и одређује формирање CDK/циклинских комплекса. Различити циклини и CDK се вежу у одређеним тачкама ћелијског циклуса и тако регулишу различите контролне тачке. Без потпуно активираних CDK/циклинских комплекса, ћелија не може да прође кроз контролне тачке. Иначе, нису ни сви циклини повезани са ћелијским циклусом (54). На крају одговарајућих фаза циклуса, следи протеолиза циклина посредована убиквитином (54). Потпуна активност CDK је регулисана фосфорилацијом конзервираних остатака треонина и тирозина (55).

Друга група регулаторних молекула ћелијског циклуса јесу негативни регулатори. Негативни регулатори заустављају ћелијски циклус. Везивање са малим инхибиторним протеинима званим инхибитори CDK (енгл. *CDK inhibitors*- CKI) је универзални механизам регулације CDK или CDK-циклинских комплекса. Постоје двије различите групе инхибитора CDK (57, 58). Три различита протеина, p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2) формирају породицу Cip/Kip протеина/инхибитора CDK-циклин комплекса (58). Неколико резултата је показало да ови молекули заустављају ћелијски циклус. Одсуство ових инхибитора резултира ембрионалним заустављањем са хиперплазијом у више ткива, укључујући цревне и хиподермалне линије, као и повећану апоптозу и недостатке у морфогенези. Бројна истраживања показују да инхибитори својим везивањем блокирају активности CDK-циклинских комплекса G₁ фазе, CDK1-циклин В комплекса, а такође делују и инхибицијом нуклеарног антигена ћелијске пролиферације (енгл. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*- PCNA) (57, 58). Кад молекулски сензори дертекују оштећење DNA, активира се мултифункционални протеин p53 зауставља ћелијски циклус и регрутује ензиме како би поправили DNA. Ако се DNA не може поправити, p53 може покреће апоптозу, не би ли се спречило умножавање оштећених хромозома. Експресија p21 је под транскрипцијском контролом тумор супресор протеина p53 (57, 58). p21 зауставља ћелијски циклус везивањем и инхибирањем активности CDK-циклинских комплекса. Hannon GJ са сарадницима у својим истраживањима показује да експресија и активација молекула p15 и p27 су последица деловања трансформишућег фактора раста β (TGF-β) што доприноси заустављању раста ћелије (59). Carnero A са својом истраживачком групом потврђује да друга група протеина која обухвата p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) и p19 (INK4d), специфично инактивирају G₁ CDKs (CDK4 и CDK6), везујући се и инхибирајући активности CDK блокањем повезивања са циклином D (57). Динамика ћелијског циклуса зависи у доброј мери и од локализације позитивних и негативних регулаторних протеина (60).

Супстрати CDK

Најбоље испитан међу супстратима различитих циклина је регулаторни протеин продукт ретинобластом супресорског гена (енгл. *Retinoblastoma Tumour Suppressor Gene*- pRb) који је супстрат CDK4/6-циклина D (61). Овај ген је одговоран за синтезу протеина- pRb који обавља онкосупресорску активност јер сузбија транскрипцију гена битних у прогресији ћелијског циклуса, као што је ген за циклин E. pRb ту улогу остварује везивањем за транскрипциони фактор, пре свега E2F па изостаје активација овог молекула, а одпочињ транскрипција гена чији производи омогућују пролазак кроз фазу S, укључујући циклин A, циклин E, Cdc25 (61, 62). Како ћелија расте, pRb се полако фосфорилише док не постане инактивиран. Фосфорилисан pRb ослобађа транскрипциони фактор E2F. Деградација и следствена инактивација p27 покренута је фосфорилацијом самог инхибитора посредством комплекса CDK2-циклин E, што је Hinds PW са сарадницима у својим истраживањима потврдио (63). Zhao J са својим тимом показује да NPAT (нуклеарни протеин мапиран на АТМ локусу) игра значајну улогу у контроли ћелијског циклуса поготову на G₁/S прелазу (64). Супстрати за комплекс CDK2-циклин E, комплекс CDK1-циклин В као и циклин А-зависне киназе представљају хистон H1, DNA полимеразу алфа примаза као и регулатори самих CDK Wee1 и Cdc25 (65-67).

1.3.1. Контрола исправости одвијања ћелијског циклуса: рестрикционе и контролне тачке

Све ћелије у организму у одговору на спољни пролиферативни сигнал отпочињу процес диобе. Оне реагују на екстраћелијске митогене и инхибиторне факторе (као што је TGF- β) само у кратком временском периоду, од почетка G1 фазе до 1-2 сата пре преласка у S фазу. Крај овог временског оквира означен је као **тачка рестрикције** (енгл: *R point*). Hartwell LH и сарадници показују да Ћелије које нијесу излагане факторима раста прије тачке рестрикције “одустају“ од активног ћелијског циклуса и враћају се у G0 фазу (68).

Током ћелијског циклуса повремено настају грешке, те су због тога ћелије развиле серију механизма који надгледају сваки корак током напредовања циклуса, и не дозвољавају ћелији да уђе у наредну фазу ако предходни корак није успјешно завршен (61). То обезбјеђује исправан редослед догађаја у ћелијском циклусу (68). У том случају, ови ћелијски монитори брзо отпочињу заустављање циклуса до откаћања грешке. Ови мониторинг механизми су названи контролне тачке- *checkpoints* или *checkpoint controls* (61, 68). Губитак кључних *checkpoint* механизма често се манифестује измењеним кариотипом, а дерегулисане активности ових *checkpoints* монитора укључене су у онкогенезу. Контролне тачке оштећења DNA су постављене прије него што ћелија уђе у S фазу (контролна тачка G1-S) или након репликације DNA (контролна тачка G2-M) и чини се да функционишу и током фаза S и M. У контролној тачки G1/S, заустављање ћелијског циклуса зависи од p53 (61). По мишљењу Levine AJ, различити агенси су способни да повећају ниво p53 протеина. То су: X зраци, UV-зраци, неки хемиотерапеутици који оштећују DNA, инхибитори синтезе DNA као и агенси који прекидају микротубуле цитоскелета (69). p53 континуирано прима сигнале из различитих система. Уколико p53 прими алармне сигнале зауставља ћелијску пролиферацију или покреће апоптозу (69). Постоје три надзорна система, који шаљу алармне сигнале молекулу p53 ако региструју оштећења или поремећај у сигнализацији. Први од њих је осјетљив на прекиде доструког хеликса DNA (енгл: DSBs – *Double-Strand Breaks*), нарочито оне који су узроковани јонизујућим зрачењем. Прекидање dsDNA, на било ком месту у геному, узроковаће значајан пораст нивоа p53 (61, 69, 70). Сензори који региструју прекиде DNA преносе сигнале до киназа ATM. Након тога ATM, преноси сигнале до киназе Chk2, која фосфорилише p53. Настала фосфорилација штити овај протеин од деструкције протеином који је назван Mdm2 (70). Ћелија надгледа активност транскрипционог фактора ARF (заједно са E2F транскрипционим фактором) да би контролисала њен pRb регулаторни механизам. Током еволуције је настало неколико начина којима се може елиминисати ћелија која има прекомерну активност E2F, и дерегулисану контролу pRb. Појачана активност E2F, индукује експресију многих гена који учествују у програму апоптозе. У ове гене спадају каспазе (типови 3, 7, 8 и 9), протеини сродни про-апоптотичком Bcl-2 (Bim, Noxa, PUMA), Araf-1 и протеин сродан p53 протеину, p73 (71). Многе студије показују да атаксија-телангиектазија-мутирани протеин (енгл. *Ataxia-Telangiectasia-Mutated- ATM*), протеин повезан са атаксијом и rad3 (енгл. *ataxia and rad3 related- ATR*) „препознају“ оштећење DNA и фосфорилишу p53, док протеин киназа DNA (енгл. DNA Protein Kinase-DNA-PK) на сада непознат начин активира ATM и ATR (72, 73). Механизми контроле ћелијског циклуса у фази S су још увек неразјашњени (61, 72-75). Контрола ћелијског циклуса у G2 фази одвија се и зависно и независно од p53 (61). Улазак у митозу се додатно спречава транскрипцијом протеина 14-3-3 који транслоцира cikin-B-CDC2 комплекс у цитоплазму и тако спречава његов одлазак у једро где је неопходан за митозу (76). Зато

можемо рећи да је p53 ”чувар генома”. Ћелијски циклус се зауставља када је оштећена DNA, тада p53 индукује експресију ензима за репарацију, а ако неке грешке у DNA ипак остану p53 онда активира програм апоптозе. p53 такође покретањем транскрипције гена Gadd45 (*Growth arrest and DNA damage inducible gene*) индукује деградацију комплекса кога чине CDK1-циклин и B1, што у својим истраживањима показује Taylor WR са сарадницима (77).

Fang G са колегама показује да „контролна тачка диобног вретена“ такође открива и хромозомске аберације у самом митотском вретену и зауставља ћелијски циклус у метафази (78).

1.3.2. Ћелијски циклус и тумори

Тумор карактеришу абнормалности у ћелијском циклусу. То је последица мутација у сигналним путевима или других лезија унутар гена који кодирају протеине регулаторе ћелијског циклуса. Аберантна активација CDK, која се често виђа код хуманих канцера представља основу за дизајнирање синтетичких инхибитора CDK-а (79).

Циклин зависне киназе

CDK молекули су често измењени у хуманим канцерима. Тако је на пример ген за CDK4 измењен у великом проценту меланома, јер се активира тачкастом мутацијом (61, 80). CDK6 се активира геномским транслокацијама у лимфомима локализованим у маргиналној зони слезине и смањује способност везивања SKI (124). Мутације CDK1 и CDK2 гена су релативно ријетке у хуманим канцерима, са нешто већом учесталошћу у фокалним карциномима (81, 82).

Циклини

Ген за циклине D представља други најчешће измјењен локус међу свим типовима канцера код људи. У једној студији трансгени мишеви који прекомјерно експримирају циклин D1 у млијечним жлездама развили су хиперплазију млијечне жлезде и карцином млијечних жлезда. Ови резултати су указали на онкогена својства циклина D. Данас се прекомерна експресија циклина D повезује са паратироидним аденомима, лимфомима, карциномима дојке, једњака, мокраћне бешике, плућа, дебелог criјева, акутних лимфобластних и акутних мијелоидних леукемија и карцинома сквамозних ћелија (61, 83). Са друге стране, карцином плућа колелира са повећаном експресијом циклина A и циклина E, стим да повишена експресија само циклина A корелира са краћим преживљавањем (61, 83).

Ензими који активирају CDK

Оштећење DNA активирају контролне тачке киназе 1 (CHK1). Активација транскрипције p53 индукује експресију инхибитора CDK- p21, што инхибира циклин комплекс E-CDK2.

Активирани CHK1 инаktivира Cdc25A и Cdc25B. Ови догађаји чине ове CDK неактивним. CHK1 је у ствари есенцијални посредник заустављања ћелијског циклуса изазваног оштећењем DNA. Прекомјерна експресија Cdc25A и Cdc25B омогућава активацију комплекса CDK-циклин и следствену онкогенезу (61, 84). Cdc25B је прекомјерно експримиран код 32% карцинома дојке. Транскрипциони фактор за Cdc25A и Cdc25B је c-тус, док је за дерегулацију функције значајна Raf киназа (61, 84).

Инхибитори циклин-зависних киназа

Типичан представник ове породице киназа, p16, хомозиготно је измијењен у великом проценту хуманих туморских ћелијских линија и такође је инаktivиран било делецијом било мутацијом у неколико специфичних врста примарних тумора (61, 85). Како је p16 специфични инхибитор комплекса CDK-циклин D и спречава фосфорилацију pRb протеина и заустављање ћелије у G1 фази ћелијског циклуса, ћелије са измијењеним p16 не могу се задржати у G1 фази. Измјене pRb, p16 и комплекса CDK/циклин D налазе се код скоро свих хуманих тумора (61, 85). Други инхибитор циклин зависних киназа, p19, дјелује независно од p16 у регулацији стабилности p53. Ген за p15, често је делецијом уклоњен заједно са p16 те ове промене коегзистирају у многим туморима (58, 61). Код карцинома, p27 се инаktivира слабијом синтезом, убрзаном разградњом (протеолиза у протеазомима) и транслокацијом, што је детектовано код многих типова хуманих тумора (плућа, дојка, бешика, дебело црево) (61). Штавише, студије у неколико типова тумора показују да ниво експресије p27 има и прогностичке и терапијске импликације.

p21 посредује у заустављању ћелијског циклуса, зависно од p53 (61, 85). Од раније је познато да p21 инхибира онкогенезу промовишући заустављање ћелијског циклуса као одговор на разне стимулусе. Уз то, p21 може да делује као главни ефектор за промоцију антипролиферативних активности, независно од p53. У карциномима дојке и леукемијама запажа се неколико различитих промјена у генима за p18 и p21 (61, 85). У ћелијама хуманих карцинома често се региструје дерегулација p21, али његова експресија у зависности од ћелијског контекста и околности, сугерише да може дјеловати бидирекционо: и као супресор тумора и као онкоген (61, 85).

Супстрат

Иако су инаktivирајуће мутације pRb ретке, смањење или губитак експресије pRb детектује се код 40% до 50% инвазивних карцинома и снажно је повезан са лошим клиничким исходом (61, 86). Ћелије канцера користе разне стратегије да би елиминисале функцију pRb, па тако је повећан ниво експресије циклина D1 регистрован у различитим ћелијама хуманих тумора, а нарочито код ћелија карцинома дојке. У овим и другим карциномима, прекомерна експресија је постигнута повећањем броја копија гена за циклин D1 или алтерисањем усходних делова сигналних путева који су нормално одговорни за контролу експресије гена за овај циклин. Ћелије карцинома дојке блокирају експресију p16 и њему сродног p15, који пак инхибирају циклин комплекс D-CDK4/6, који је одговоран за иницијацију фосфорилације pRb. У одсуству протеина p16, фосфорилација и инаktivација pRb је дерегулисана. Gage JR са сарадницима је показао да неки вирусни протеини такође

инактивирају pRb (87). Губитак функције pRb чест је и код акутне лимфобластичне леукемије, што потврђује Horsthemke В са сарадницима (88). Повезаност осталих чланова породице pRb- p107 и p130 још увијек није са мутацијама које промовишу настанак тумора још није јасно потврђена као и што нису описане мутације гена транскрипционих фактора фамилије E2F, што наводи и Bartek Ј у својој студији (89).

1.3.3. Протеини контролних тачака

Без p53, грешка у геному „ће проћи“ и таква ћелија преживљава иако су у њој акумулиране мутације. Повећана мутабилност повећава ниво активације онкогена и инактивације тумор-супресорских гена (90). Код скоро половине оваквих тумора, протеин p53 је измењен мутацијом гена p53 (61, 90). У осталим туморима, недостаје протеин ARF или је Mdm2 прекомерно експримиран (61, 90). Други механизми, као што је учешће вирусних протеина могу да промјене или блокирају функцију p53 (61, 90). Тумори са мутираном формом p53 имају лошију прогнозу (61, 90).

1.3.4. Инхибитори циклин зависних киназа у развоју антиантитуморских љекова

Циклин зависне киназе (CDK), представљају породицу протеина који учествују у регулацији ћелијског циклуса и често су прекомерно експримиране или мутиране у канцерима. Посљедњих година сведоци смо развоја и испитивања бројних хемијских инхибитора као терапеутика против тумора. Две доминантне стратегије у дизајнирању инхибитора подразумевају индиректну стратегију- усмерену на модулаторе активности CDK и директну стратегију- усмерену на активност самих CDK (61). Индиректна стратегија се фокусира на модулацију експресије СКI и других ензима који регулишу CDK (122). Клиничка испитивања у оквиру директне стратегије показала су да су инхибитори CDK4/6 релативно ефикасни, и они су сада постали стандардни третмани за лечење узнапредовалог карцинома дојке са позитивним статусом хормонских рецептора (61). Неки од директних инхибитора CDK су у стању да прођу крвну-мождану баријеру и могу представљати ефикасну терапију за примарне и метастатске малигне централног нервног система. Потребна су додатна клиничко-транслацијска истраживања да би се побољшала стратегија избора пацијената и комбинаторно лијечење инхибиторима CDK4/6 рака дојке и других малигнух обољења (61).

1.4. Ћелијска смрт

1.4.1. Апоптоза

Керт-а и сарадници су 1972. први пут у својој публикацији употребили термин апоптоза (a-po-toe-sis). Описали су ћелијску смрт морфолошки различит од до тада познатих механизма (91,92). Већину сазнања о процесу апоптозе данас дугујемо истраживањима на нематоди *Caenorhabditis elegans* (93). Од 1090 новонасталих ћелија током ембриогенезе 131 подлијеже апоптози. Од тада је апоптоза посебан облик „програмиране“ ћелијске смрти, а описани су и други облици програмиране ћелијске смрти (94). По мишљењу Norbury CJ и сарадника, апоптоза је незаобилазан процес током развоја и старења али и као одбрамбени механизам (95). Апоптоза одржава број ћелија у тијелу одговарајућим. Значај овог процеса је да формирањем нових и елиминисањем старих ћелија, приближно укупни број ћелија одржи истим. Изгледа да апоптоза која је одговорна за рутинско одржавање равнотежног стања у тијелу, не зависи од p53. Функција p53 активира се у хитним случајевима у ћелијама. Током онкогенезе, организам активира p53 да елиминира ћелије које имају малигни потенцијал, укључујући и ћелије које садрже мутације које ремете регулацију раста и оне које имају више грешака у геному. p53 покреће апоптозу тако што индукује експресију неколико нисходних таргет гена који кодирају компоненте-машинерије апоптозе. Ту спадају и гени који кодирају различите про-апоптотске протеине. У исто време, p53 умањује експресију гена за анти-апоптотске протеине. p53 дјелује као цитостатик јер зауставља напредовање ћелијског циклуса, али и активира апоптотски програм и води ћелију у смрт. Који ће се механизам активирати зависи од типа стреса или генетског оштећења, врсте ћелије и присуства других про или анти-апоптотских сигнала. На биохемијском нивоу, још увек није познато како p53 одлучује између ове две опције. Hirsch T са сарадницима наводи да се апоптоза разликује од некрозе, а да се ова два механизма ћелијске смрти могу одиграти независно али и истовремено (96).

1.4.2. Морфологија апоптозе

Током процеса апоптозе ћелија пролази кроз низ морфолошких промјена (97). Апоптоза се одиграва у појединачним ћелијама или у малим групама ћелија. Морфолошке карактеристике апоптозе су кондензовање хроматина, бубрење мембране и смањивање ћелије, а често и стварање мањих делова- такозвана мембранозна тијела (91). У току првих неколико минута, на плазма мембрани се формирају структуре које су означене као **blebs**; површина ћелије изгледа као „прокувана“. Нуклеаза цепа молекула DNA између нуклеозома и ствара карактеристичан деградациони продукт апоптозе. Једно- се згушњава процесом **пикнозе**- током којег се оно цепа у дјелове уз истовремено фрагментирање хромозома (121). Пре губитка интегритета плазма мембране фосфолипиди прелазе са унутрашње на спољашњи део плазма мембране. Ћелије макрофага фагоцитишу апоптотне ћелије пре него што садржај умируће ћелије буде ослобођен. Препознавање се дешава због фосфолипида, фосфатидил-серина, који се сада налазе са спољашње стране ћелијске мембране. Обично у року од сат времена, апоптотна ћелија је издељена на мале фрагменте, који су названи апоптотна тела и њих брзо уклањају суседне ћелије или локални ткивни макрофаги, тако да не остају било какви трагови. Ова фагоцитоза путем макрофага зависи од присуства сигнала „поједи ме “ који је на површини ћелије која улази у апоптозу. Наиме, нормална ћелија експримира фосфатидил-серин на унутрашњој страни плазма

мембране. Током апоптозе, фосфатидил серин је на спољашњој страни мембране и њега препознају специјализовани анексин рецептори на површини макрофага. Макрофаг се везује за апоптозну ћелију и активира фагоцитозу. Због тога апоптотско умирање ћелије не активира инфламацијски одговор. Savill J са сарадницима закључује да апоптозу као ни уклањање апоптотских ћелија не прати инфламација јер: (1) овако усмрћене ћелије не ослобађају свој садржај у интерстицијално ткиво; (2) брзо их фагоцитују околне ћелије што не даје времена да се одигра секундарна некроза (98).

1.4.3. Некроза. Апоптоза vs. некроза

Апоптоза се описује као активна, програмирана ћелијска смрт, док се некроза описује као пасивна, случајна ћелијска смрт која је последица оштећења ћелијске мембране праћена неконтролисаним ослобађањем ћелијског садржаја. Данас, термини „онкотска“ ћелијска смрт и онкотска некроза представљају алтернативне називе за смрт ћелије која подразумева бубрење, иако нису у широкој употреби, наводе Мајно G и сарадници (99).

Питање које је често занемарено у литератури о ћелијској смрти је разлика између структурних и биохемијских процеса који се одвијају у ћелији која умире и сам крај смрти. Процес и морфологија апоптозе и некрозе се доста разликују, иако постоји преклапање, па исход ћелијске смрти дјелимично зависи од природе сигнала који је узрок ћелијске смрти, типа ткива, развојне фазе и микросредине, што потврђују бројна истраживања (100-102). Некроза је термин који се тренутно користи за не-апоптотску, случајну ћелијску смрт. Некроза је појам који користе патолози за означавање присуства мртвог ткива или ћелија и збир је промјена које су се догодиле у ћелијама. Некроза је процес ћелијске смрти праћен бубрењем ћелије, бубрењем органела и повећањем пропустљивост мембране. Процес некрозе у коначници исцрпљује залихе ћелијске енергије и прати га крах рада јонских пумпи у плазма мембрани. Може бити последица токсичности агенаса који ометају стварање АТФ-а или процесе који могу проузроковати неконтролисану потрошњу енергије у ћелији.

Ћелија која умире некрозом има дифузно једро и губитак структуре органела (91). Улазак воде у ћелију узрокује отицање и руптуру мембране. Тумори са интензивном некрозом имају лошију прогнозу, због убрзаног раста. Друга битна карактеристика некрозе је инфламација. Садржај умируће ћелије ослобађа медијаторе, DAMP, који активирају инфламацијски одговор. Инфламација оштећује ткива, али покреће и систем поправке и пролиферације, што помаже онкогенези и експанзији тумора. Инфламација се сматра главном компонентом напредујуће туморогенезе. Супротно овоме, апоптотске ћелије не ослобађају своје ћелијске састојке у околно интерстицијално ткиво и брзо их фагоцитују макрофаги или сусједне нормалне ћелије те нема пратеће запаљенске реакције (98). Пасивна некроза се јавља када је ћелија ирверзибилно оштећена спољашњим узроцима или када су есенцијални процеси прекинути или блокирани. Активна некроза се односи на поремећаје ћелијских процеса и догађаја. У већини случајева некроза кореспондира са ћелијском саботажом, али постоје форме које могу да се класификују као "самоубиство".

Посебан облик некрозе је каспаза- независна ћелијска смрт (енгл. *Caspase-independent cell death*- CICD. Дешава када се ћелија подвргне митохондријалној апоптози (MOMP), али је активност каспазе блокирана. Сматра се да је један од разлога енергетски крах ћелије изазван MOMP-ом. Уколико ћелија преживи CICD може допринети настанку тумора или резистенцији на хемиотерапију.

Најчешћи узрок некрозе код тумора је исхемија, губитак снабдевања тумора крвљу. Први и главни разлог исхемије је депривација кисеоника и хранљивих материја, што се може карактерисати као пасивна некроза. Други главни пут исхемије је комбинација исхемије и реперфузије. Парадоксално реперфузија предходно исхемичног ткива резултира масивном некрозом. Може се класификовати као форма ћелијске саботаже и активне ћелијске смрти. Постоје три компоненте овог процеса, повећање интрацелуларног калцијума, продукција слободних радикала и поремећај митохондрија. Интрацелуларни калцијум активира протеазу *calpain* која има протеолитичко дејство и доприноси стварању ROS. Ca^{++} и ROS убрзавају процес некрозе кроз процес који се зове митохондријална транзициона пропустљивост. Стварају се "поре" у мембрани чиме се нарушава градијент и убрзава пропадање органеле. Једна од познатих компоненти транзиционе поре је *cyclophilin D*.

1.4.4. Механизми апоптозе

Механизми апоптозе су веома комплексни. Постоје два главна апоптотска пута: спољашњи или пут рецептора смрти и унутрашњи или митохондријски пут. Међутим, сада постоје докази да су ова два пута повезана и да молекули једног пута могу утицати на други пут, што закључује и Igneu FH (103). Постоји и додатни пут који који озпочињу цитотоксички Т-лимфоцити и убијање ћелије које не зависи од перфорина и гранзима. Перфоринско-гранзимски пут може индуковати апоптозу преко гранзима Б или гранзима А. Спољашњи, унутрашњи и пут гранзима Б карактерише активација каспазе-3 и фрагментација DNA (121). Пут гранзима А активира апоптозу независну од каспаза (104).

1.4.5. Спољашњи пут апоптозе

Рецептори смрти су подгрупа површинских ћелијских рецептора који су чланови TNF суперфамилије рецептора (енгл. *tumor necrosis factor receptor* TNFR). Рецептор активирају лиганди из TNF суперфамилије (105). Рецептори смрти обухватају рецепторе TNF, TNFR1, TRAIL, CD95 (Fas, APO1). Активирани рецептор покреће апоптозу. Иницијаторска каспаза је каспаза 8 и активација платформе обухвата адаптер протеин, FADD, који се везује за продомен каспазе, омогућавајући формирање активног димера (105). Најједноставнији процес је забележен код везивања лиганда за CD95 (105). Везивање лиганда за CD95 омогућава доступност региона који везује FADD интрацелуларно. Везивање TNF-а за свој рецептор омогућује везивање адапторског протеина TRADD који у даљем току процеса регрутује FADD и RIP, што су Ashkenazi А и сарадници показали у свом истраживању (105). Неколико рецептопра и повезани FADD чине каспаза актовациону активациону платформу, каспаза 8 активира FADD. Протеолитичка активност отклања продомен везане каспазе 8 и ослобађа се нови стабилизовани димер (105). Апоптоза активирана преко рецептора смрти може бити инхибирана протеином званом с-FLIP. с-FLIP_L личи на каспазу 8 и читав процес постаје неефикасан (106). Уколико је присутан с-FLIP_L, хетеродимерна форма каспаза 8- с-FLIP_L не активира апоптозу. Hitoshi, Y са сарадницима показује да Toso протеин у Т лимфоцитима блокира апоптозу индуковану Fas-ом инхибицијом обраде каспазе-8 (107).

1.4.6. Перфорин/гранзимски пут апоптозе

Перфорин/гранзимски пут апоптозе је пут који користе цитотоксички лимфоцити за елиминацију ћелија заражених вирусом и/или трансформисаних ћелија. Студије на анималним моделима показују да перфорин, у комбинацији са гранзимом, може изазвати апоптозу. Од виталног је значаја за функцију ефекторске имуности и игра незаменљиву улогу у индукцији апоптозе. Ефекторски лимфоцити су способни да убијају циљане ћелије и преко спољашњег пута апоптозе, FasL/FasR интеракције (108).

Перфорин је протеин који формира поре и такође је познат и као токсин цитоплазматских гранула. Гранзими су породица структурно повезаних серинских протеаза које се чувају унутар цитотоксичких гранула цитотоксичких лимфоцита. Перфорин и гранзим заједнички индукују апоптозу циљних ћелија (109). Гранзими су неопходни за покретање апоптозе циљних ћелија, али зависе од тога да ли их перфорин на одговарајући начин испоручи. И перфорин и гранзими се вежу за површину циљне ћелије као део једног макромолекуларног комплекса повезаног са серглицином, што додатно смањује вероватноћу пасивне дифузије гранзима.

Једном када их цитотоксички лимфоцити излуче, гранзими улазе у циљне ћелије. Гранзим Б углавном покреће активацију каспазе индиректно, а не директном обрадом каспазе. То се постиже:

- разлагањем протеина на резидуама аспартата и следственом активацијом прокаспазе-10;
- разлагањем фактора као што је инхибитор каспазом активирание DNA-зе- ICAD (енгл. *Inhibitor of Caspase Activated DNase*) (109);
- директним активирањем про-апоптотичних чланова из Bcl-2 породице, као што је агонист домена смрти Bid и индукцијом ослобађања цитохрома C (109).

Ови процеси резултују истицањем про-апоптотичких митохондријских медијатора, као што је цитохром C, у цитосол. Ослобађање цитохрома C активира про каспазу-9, а везивањем на фактор 1 који активира апоптотску протеазу (Araf-1), про каспаза-9 постаје активна каспаза-9, која наставља да формира апоптозом и активира каспазу-3. Активирана каспаза-3 може цијепати специфичне супстрате и започиње фрагментацију једра. Гранзим В може и директно да активира каспазу-3, и митохондријски пут и директна активација каспазе-3 кључни су за апоптозу индуковану гранзимом В, што дискутује и Tgran1 JA у свом прегледном раду (109). Ова функција гранзима В важан је као контролни механизам за експанзију типа 2 помагачких Т лимфоцита (Th2) (109).

Гранзим А активира каспаза независни пут апоптозе тако што индукује губитак потенцијала унутрашње мембране митохондрија и ослобађање реактивних врста кисеоника (ROS). Наиме, гранзим А активира разлагање DNA (109). Као одговор на ROS, SET комплекс који чине SET, Ape1, pp32 и HMG2 премешта се у једро, где гранзим А цепа три члана SET комплекса који су укључени у поправку DNA што резултира у апоптотичној деградацији DNA (109).

1.4.7. Унутрашњи пут апоптозе

Интрацелуларни сигнали, попут оштећења DNA ћелије, покрећу апоптозу првенствено унутрашњим путем. Властити пут апоптозе, који укључује сачуване сигналне протеине, физички је повезан са митохондријима, а код кичмењака је осетљив на оксидативни стрес митохондрија. На тај пут утичу чланови породице Bcl везани за митохондријску мембрану, укључујући Bак и Bcl-2 ген, који дјелују као про- или анти-апоптотички регулаторни

протеини. Апоптоза се покреће пермеабилацијом спољне мембране митохондрија, која се јавља најчешће као одговор на новонастале поре дејством Bax и Bak (проапоптотски чланови породице Bcl-2). Повећана пропустљивост митохондрија резултира ослобађањем из митохондријског интермембранског простора различитих модулатора ћелијске смрти као што су цитохром C, фактор индукције апоптозе (AIF), ендонуклеаза G, Smac/DIABLO или HtrA2/Omi (110, 111), као и престанак синтезе митохондријалне АТФ, инхибиција респираторног ланца и повећана производња реактивних кисеоничких врста (ROS). Smac/DIABLO и HtrA2/Omi инхибирају IAP (протеини инхибитори апоптозе; енгл. (inhibitors of apoptosis proteins) (113). Способност везивања за IAP није довољно за „про-апоптотску“ активност молекула (113). Конкретно, цитохром C дјелује у интеракцији са фактором 1 који активира апоптотички протеазу (Araf-1) и стимулише олигомеризацију Araf-1 зависну од АТФ-а у комплекс који активира каспазу познат као апоптозом (112). Araf-1 затим регрутује иницијаторску прокаспазу-9 путем регрутних домена каспазе. Једном везана, активна каспаза-9 затим обрађује ефекторску каспазу-3 и изазива смрт ћелије. Апоптоза унутрашњим путем даље се дијели на облике који зависе и који не зависе од каспаза. AIF и ендонуклеаза G функционишу независно од каспаза, о чему и Elmore S говори у свом прегледном раду (121).

Апоптоза унутрашњим путем (позната и као митохондријална апоптоза) може се активирати мноштвом сигнала, укључујући интрацелуларно оштећење и такозваним онкогеним стресом. Еукариотске ћелије имају мноштво интраћелијских сензора који реагују на овакве поремећаје активирањем сигналних путева за поновно успостављање хомеостазе и поправком оштећења, а затим, ако је оштећење ненадокнадиво, индукцијом апоптозе. Li, L. Y са сарадницима показује да друга група про-апоптотских протеина, AIF, ендонуклеаза G и CAD након уласка у једро производи фрагментацију DNA и кондензацију периферног нуклеарног хроматина- рана форма кондензације једра (114). CAD се касније транслоцира у нуклеус и покреће касну форму кондензације једра (114).

По мишљењу многих аутора за контролу и регулацију ових догађаја у митохондријама одговорни су чланови Bcl-2 фамилије протеина (115). В ћелијска леукемије/лимфома 2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*- Bcl-2) фамилија протеина чврсто контролише активацију унутрашњег пута апоптозе. Откриће ових протеина је повезано са хромозомском транслокацијом t(14;18). Транслокација измјешта Bcl-2 ген на хромозом 18 и ставља га под контролу транскрипционих фактора за имуноглобулинске гене. Постоје про- и анти-апоптотски чланови Bcl-2 фамилије. До данас је у Bcl-2 породици гена идентификовано укупно 25 гена. Протеини из једне подгрупе, укључујући Bid, Bad, Bim, Bmf, Puma и Noxa, садрже један Bcl-2 хомологни домен 3 (BH3-only протеини) и дјелују про-апоптотски. Ови протеини могу хетеродимеризовати са Bcl-XL или Bcl-2, неутралишући њихов заштитни ефекат и промовишући ћелијску смрт (118, 121). Двије друге групе протеина имају вишеструке BH3 домене. Прва подгрупа, укључујући Bcl-2 повезан протеин (Bax), Bcl-2 хомологни антагонист (Bak) и Bcl-2 регулатор апоптозе (Bok), јесу про-апоптотички молекули; док другу подгрупу, укључујући Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1 чине анти-апоптотички молекули. Bcl-2 и Bcl-XL инхибирају апоптозу прије свега контролисањем активације каспаза (118, 121). Додатни протеин означен као "Aven" наизглед се веже Bcl-XL и Araf-1, чиме се спречава активација прокаспаза-9 (118). На митохондријални пут апоптозе дјелимично утичу и чланови породице Bcl везани за митохондријску мембрану, укључујући про-апоптотичне регулаторне протеине Bax и анти-апоптотичке регулаторне протеине Bcl-2. Хомо-ологомеризација проапоптотских "ефектора" отвара поре и узрокују МOMP, док про-апоптотски "активатори" BH3-only протеини (BID, BIM и вероватно

PUMA) директно интерагују са BAX и BAK узрокујући алостеичне промене и активацију (121). Puma и Noxa су два про-апоптотска члана Bcl2 фамилије. Liu FT и сарадници су показали да прекомјерну експресију Puma прати повећана експресија BAX, транслокацијом у митохондрије и ослобађањем цитохрома C (119). Noxa се може локализовати у митохондријама гдје интерреагује са анти-апоптотским члановима Bcl-2 фамилије, што активира каспазу-9, како су то утврдили Oda E и сарадници у свом истраживању (120). Тумор супресорски протеин p53 игра централну улогу у регулацији протеина породице Bcl-2, о чему говоре и Schuler, M и сарадници (116). Сматра се да је главни механизам дјеловања протеина породице Bcl-2 регулисање ослобађања цитохрома C из митохондрија модулацијом пропустљивости митохондријске мембране (117). Оштећење митохондрија у Fas путу апоптозе је посредовано цијепањем Bid протеина каспазом-8 и примјер је „унакрсне реакције“ између спољашњег унутрашњег пута апоптозе (103, 114).

1.4.8. Егзекуторски пут апоптозе

Завршница апоптозе започиње активацијом ефекторских каспаза које активирају цитоплазматске ендонуклеазе и разграђују једарни материјал, као и протеазе које разграђују једарне и цитоскелетне протеине (121). Каспазе 3, 6 и 7 функционишу као ефекторске каспазе које разлажу различите супstrate укључујући цитокератин, цитоскелетни протеин плазма мембране, протеин α -тубулина потребан за успостављање морфологије ћелије и нуклеарни протеин NuMa, што на крају изазива морфолошке и биохемијске промјене које се виде у апоптотским ћелијама (121, 122).

Бројна истраживања указују да промене на митохондријама које прате апоптозу ослобађају цитохром-C и Smac из митохондрија, праћеног стварањем апоптозома и активацијом каспаза (121). Тим процесом се регрутује и активира иницијаторска каспаза-9, који наставља да активира ефекторске каспазе, нарочито каспазу-3. Каспазну активност инхибира XIAP. Активација каспазе након ослобађања цитохрома-C и Smac дешава се за неколико минута, међутим, тај брзи одговор знатно се успорава када је концентрација XIAP у цитоплазми велика, што може бити посебно важно код карцинома јер је XIAP прекомерно експримиран код великог броја тумора.

Каспаза-3 се сматра најважнијом ефекторском каспазом и активира се било којом иницијаторском каспазом (каспаза-8, каспаза-9 или каспаза-10). Претходна истраживања показују да каспаза-3 активира CAD ендонуклеазе које су спрегнуте са својим инхибитором ICAD (121, 122). У апоптотским ћелијама активирана каспаза-3 одваја ICAD и ослобађа CAD, који пак разграђује хромозомску DNA и изазива кондензацију хроматина (122). Такође индукује цитоскелетну реорганизацију и дезинтеграцију ћелије у апоптотска тјелшца која преузима фагоцит. Фагоцитоза апоптотских ћелија и фрагмената је последња компонента егзекуторске апоптозе. Коначно резултира поремећајем цитоскелета, интрацелуларним транспортом, дјељењем ћелија и преносом сигнала (121, 122).

1.4.9. Физиолошка апоптоза

Апоптоза је физиолошки значајна исто колико и митоза. Процјењује се да је за одржавање хомеостазе одраслог људског тијела, око 10 милијарди ћелија се сваког дана створи само да би се одржао баланс са онима које умиру од апоптозе (123). Сврха апоптозе је елиминисање непотребних ћелија и одржавање нормалне морфогенезе. Лабораторијски

мишеви којима су генетски одстрањене различите кључне компоненте апоптозне машинерије развијају разноврсне дефекте: вишак неурона у мозгу, абнормалности лица, прстију, непца и сочива. Током развоја мозга више од половине првобитно формираних неурона се елиминише апоптозом. Апоптоза је важан механизам физиологије нормалних ткива. На пример, у танком цреву епителне ћелије се континуирано елиминишу апоптозом; више од 95% еритробласта се елиминише, током еритропоезе, у костној сржи. У случајевима када је транспорт кисеоника смањен због крварења, анемије или ниског притиска кисеоника у околини, ниво еритропоетина брзо расте и блокира апоптозу еритробласта омогућавајући им да sazре у функционалне еритроците, што повећава концентрацију еритроцита у крви. Допринос апоптозе нормалној физиологији приказан је и регресијом ћелија млечне жлезде током одвикавања младунаца од дојења. Више од 90% епителних ћелија у млечној жлезди које стварају млеко за потомство, умиру апоптозом током регресије која је названа **инволуција** (121, 124). И нервни и имунски систем настају прекомјерном пролиферацијом и смрћу ћелија које не успију направити функционалну синаптичку везу односно продуктивне специфичне рецепторе за антиген, на шта указује и Renehan AG у свом раду (124). Бројне студије показују да је апоптоза такође неопходна да би се тијело ослободило ћелија инвадираних патогенима (121, 124). Апоптоза је такође неопходна да би се елиминисали активирани или аутоагресивни лимфоцити током сазријевања у централним лимфним органима (коштана срж и тимус) или у периферним ткивима (121, 124). Harman D са сарадницима показује да оксидативни стрес игра битну улогу у настанку апоптозе код остарелих ћелија (125).

1.4.10. Патолошка апоптоза

Скрашње студије показују да поремећаји процеса смрти ћелија представљају значајну компоненту потогенезе болести као што су: тумори, аутоимунски лимфопролиферативни синдром, AIDS, исхемија и неуродегенеративне болести као што су Паркинсонова болест, Алцхајмерова болест, Хунтингтонова болест, и Амиотрофична латерална склероза (121). Како аутори наводе, нека стања карактерише „недовољна апоптоза“, док друга карактерише „прекомерна апоптоза“ (121).

Kerr JF и сарадници закључују да је тумор примјер гдје су нормални механизми регулације ћелијског циклуса дисфункционални, праћени прекомјерном пролиферацијом ћелија и/или инсуфицијентним уклањањем ћелија са грешком (126). Инхибиција апоптозе или отпорност ћелије на исту играју битну улогу у онкогенези (126). Постоји много начина којим ћелија може инхибирати апоптозу или стећи резистенцију на апоптозу. Генерално, механизми помоћу којих се супримира апоптоза могу се подијелити на: 1) поремећену равнотежу про-апоптотичких и анти-апоптотичких протеина, 2) смањену функцију каспазе и 3) ослабљену сигнализацију са рецептора смрти.

За многе протеине се наводи да показују про- или анти-апоптску активност у ћелији. У регулацији ћелијске смрти није важна апсолутна количина, већ однос ових про-и анти-апоптотских протеина. Поред тога, откривено је да прекомерна или експресија одређених гена (отуда резултирајући регулаторни протеини) доприносе онкогенези смањујући апоптозу у ћелијама тумора. Када постоји поремећај у равнотежи анти-апоптотских и про-апоптотских чланова Bcl-2 породице, резултат је дисрегулисана апоптоза у погођеним ћелијама. Ово може бити посљедица прекомјерне експресије једног или више анти-апоптотских протеина као што је Bcl-2 или недовољне експресије једног или више про-

апоптотских протеина као што је Bак или комбинације оба (121). Иначе, експресију и Bcl-2 и Bак-а регулише антионкогени протеин p53 (126). Одређени облици хуманих лимфома В ћелија имају прекомјерну експресију Bcl-2, што је доказ да је поремећај механизма ћелијске смрти врло важан у процесу канцерогенезе ових тумора (126).

Супресија апоптозе код тумора је један од механизма избјегавања имунског надзора над настанком и прогресијом малигно измењених ћелија (126). Неке ћелије имунског система (Т лимфоцити и NK ћелије) уништавају туморске ћелије активацијом апоптозе преко перфорин/гранзим В или преко рецептора смрти. Да би избјегле имунски систем, неке туморске ћелије ће инхибирати одговор преко рецептора смрти са FasL на Т лимфоцитима. Идентификовано је неколико абнормалности у сигналним путевима смрти које могу довести до избегавања спољашњег пута апоптозе. Такве абнормалности укључују смањену експресију рецептора смрти или нарушавање функције рецептора без обзира на механизам или врсту оштећења, експресију нефункционалног Fas рецептора, секрецију велике количине солубилног облика Fas рецептора који ће везати Fas лиганд, а сви они доприносе смањеној сигнализацији и следственој инхибицији апоптозе (126). Смањивање експресије рецептора у неким студијама је назначено као механизам стечене резистенције на лекове. Откривено је да смањена експресија Fas рецептора има улогу у генези разних малигнома (121). Забиљежено је и да смањена експресија мембранских рецептора смрти игра улогу у избјегавању путева сигнализације смрти код различитих карцинома. Дакле, промјене различитих сигналних путева у ћелији дисрегулише апоптозу и канцерогенезу. Тумор супресорски ген p53 је транскрипциони фактор који контролише ћелијски циклус и најчешће је инактивиран ген у туморогенези (126). Давно је откривено да су се у оквиру група породица чешће јављали различити тумори, укључујући глиобластому, леукемије, карциноме дојке, плућа и панкреаса, Wilms-ов тумор и саркоме меких ткива. Међу неким фамилијама (рођацима), половина чланова бива погођена неким од поменутих карцинома, а две трећине њих развијају неки тип канцера до 22.-ге године. Неки чланови фамилије имају истовремено неколико типова канцера. Познати фамилијарни канцерогени синдром, назван је *Li-Fraumeni* по хуманим генетичарима који су га открили и описали. Касније, 1990.-те, осам година након што је први пут описан овај синдром, научници су открили да већина оболелих од овог синдрома има мутиран алел на хромозому 17p13-тачно где је лоциран p53 ген. Код 70% ових мултиканцерских фамилија, мутирани алели p53 се преносе поштујући Менделова правила. Чланови фамилије који су наследили мутирани p53 алел имају велику шансу да развију неки од облика малигнитета, у раним годинама живота. Старосна доб у којој се јављају ови различити малигнитети, варира: око 5 година за адреналне карциноме, 16 година за саркоме, 25 година за туморе мозга, 37 година за туморе дојке, и скоро 50 година за туморе плућа. Изгледа да мутирани p53 алели, условљавају настајак предиспозиције особе која их носи за настајак различитих облика малигнитета. Данас знамо да различити мутирани алели који се преносе кроз герминативне ћелије, у породицама са *Li-Fraumeni* синдромом, носе различите тачкасте мутације на p53 обрасцу за читање (126).. Анализа ових мутација показала је преминацију G:C према A:T замени на CpG местима. Последњих година, проучавањем сличних фамилијарних канцерских синдрома ушло се у траг другим компонентама p53 циркулаторног круга. Ген за p53 може бити оштећен зрачењем, различитим хемикалијама и вирусима као што је Хумани папилома вирус (енгл. Human papillomavirus- HPV). Такође је показано да је атаксија телангиектазија- мутирани ген (енгл. *ataxia telangiectasia-mutated gene- ATM*) укључен у туморогенезу преко сигналног пута ATM/p53 (121). Један од механизма овог дешавања је ATM зависна фосфорилација p53 (126).

Осим описаног доприноса настанку и развоју тумора инхибиција апоптозе је одговорна и у развоју других болести као што је на пример аутоимунски лимфопролиферативни синдром (енгл. *autoimmune lymphoproliferative syndrome- ALPS*) (127). Аутоимунски лимфопролиферативни синдром је болест код које генетска оштећења у програмираној ћелијској смрти индукују дисбаланс хомеостазе лимфоцита и нормалне имунске толеранције. Оболели одове болести имају хронично увећање слезине и лимфних чворова, различите манифестације аутоимуности и повишење нормално ретке популације „двоструко негативних Т лимфоцита“. Ово се дешава када не функционише апоптоза аутореактивних Т лимфоцита, што је један од круцијалних услова развоја вишеструких аутоимунских болести (127). Неке од уобичајених болести ALPS укључују хемолитичку анемију, имуно-посредовану тромбоцитопенију и аутоимунску неутропенију (127). Различите манифестације овог поремећаја се објашњавају различитим мутацијама, па тако Тип 1А настаје као резултат мутације гена за домене смрти рецептора за Fas, тип 1В је резултат мутације у гену за Fas лиганд, а тип 2 је последица мутације гена за каспазу-10 што смањује њену активност, што су показали Worth A и сарадници (127).

Истраживања Li CJ и сарадника потврђују да је синдром стечене имунодефицијенције примјер аутоимунске болести која је резултат инфекције вирусом хумане имунодефицијенције (128). Овај вирус инфицира CD4⁺ Т лимфоците везивањем за CD4 рецептор. Вирус се потом инсертује у Т-лимфоцит где HIV Tat протеин повећава експресију Fas рецептора, што индукује апоптозу Т лимфоцита (121, 128).

Алцхајмерова болест је неуродегенеративно стање за које вероватно да је последица мутацијаа одређених протеина као што су APP (амилоидни прекурсорски протеин, енгл. amyloid precursor protein) и пресенилини (121, 129). За пресенилине се сматра да су укључени у обраду APP до амилоида β. Ово стање је повезано одлагањем амилоида β у екстрацелуларним депозитима тј плакове а амилоид β се сматра се да су агрегирани плакови неуротоксични (121, 129). Амилоид β индукује апоптозу појачавањем оксидативног стреса или активирањем повећане експресије Fas лиганда у неуронима и ћелијама глије (121, 129). Такође може да активира микроглију, што би резултовало излучивањем TNFα и активацијом TNF-R1, што доводи до апоптозе, што је показано студијом Ethell DW и сарадника (129).

Прекомјерна апоптоза се такође сматра важном у разним исхемијским повредама (121). Једна хипотеза је да штета настала исхемијом покреће апоптозу, али ако је исхемија продужена, настаје некроза. Ако се обнови производња енергије, као код реперфузије, апоптотичка каскада коју је иницирала исхемија може се наставити (121).

1.4.11. Други облици ћелијске смрти

Постоје докази о другим облицима неапоптотске програмиране ћелијске смрти који могу пружити нове увиде у програме смрти ћелије и открити њихове потенцијално јединствене улоге у развоју, хомеостазе, неоплазији и дегенерацији (121). Други типови ћелијске смрти могу захтијевати активацију гена и функционишу на енергетски завистан начин, они се такође сматрају облицима „програмиране ћелијске смрти“.

Постоје фенотипови налик некрози који захтијевају активацију гена и синтезу протеина па су, строго говорећи, облици програмиране ћелијске смрти (130). Ови облици смрти ћелија које имају одређене морфолошке карактеристике и некрозе и апоптозе названи су „апонекроза“ (130). Утицајем на митохондријални респираторни ланац са антимицином А,

Формигли и сарадници индуковали су врсту ћелијске смрти која је дијелила динамичке, молекуларне и морфолошке особине са апоптозом и некрозом (121, 130). RIPK1 киназа може да промовише ову форму некрозе. Подразумева активацију друге киназе RIPK3 која се везује за RIPK1, али може и независно да изазове некрозу. За сада је непознат тачан механизам RIPK3 активације. RIPK1 регрутује FADD за формирање каспаза активационе платформе заједно са каспазом 8 и c-FLIP_L. Каспаза 8-c-FLIP_L хетеродимер је активна протеаза али не промовише апоптозу. Ова активност игра важну улогу у ћелији тако што инхибира RIPK3. Једна врста терапије тумора укључује једињења која се зову *Smac mimetics*, дизајнирани да имитирају ефекат IAP антагониста (Smac) током МОМР. Ови агенси циљају ћелијске IAP (инхибитори апоптозних протеина, енгл. *Inhibitors of apoptosis proteins*) молекуле, c-IAP1 и c-IAP2. c-IAP молекули су Е3 лигазе које циљају између осталог и RIPK1 и RIPK3. У здравим ћелијама c-IAP смањује акумулацију ових киназа и спречава њихову активацију. Када је ћелија изложена Smac миметцима киназе се накопљају, али уколико је присутан c-FLIP_L неће доћи до ћелијске смрти. Sperandio и сарадници (131) су описали облик програмиране ћелијске смрти која је морфолошки и биохемијски различита од апоптозе, названа „параптоза“. Иако овај облик смрти ћелија не реагује на инхибиторе каспазе или BCL-XL, он се покреће активношћу алтернативног облика каспазе-9 који је независан од Apaf-1 (131).

1.4.12. Аутофагија

Аутофагија представља још један механизам за програмирану ћелијску смрт и игра важну улогу у ћелијском одговору на депривацију нутријената (121, 132). Други појмови који се користе као синоними су „макроаутофагија“ и „Аутофагична ћелијска смрт типа II“ (133). Аутофагија је начин на који ћелија сакупља интрацелуларне протеине, цитоплазму и органеле и доставља их лизозомима који их разграђују и рециклирају (133). Најзначајнија је макроаутофагија. Стварају се двослојне мембранске везикуле које се зову аутофагозоми који се спајају са лизозомима (133). Аутофагија има двојаку улогу. Може да има тумор супресорску улогу тако што одржава здравље ћелије, а може и да промовише настанак и пре свега прогресију тумора. Постоје две главне функције аутофагије. Прва је да се елиминира оштећење или вишак протеина, као врста контроле квалитета протеина и органела. Друга улога је да разграђују и рециклирају унутарћелијске компоненте, да одржи метаболизам и хомеостазу у одсуству хранљивих материја, такозвана катаболичка функција аутофагије. Аутофагија је присутна и код нормалних ћелија. Недостатак аутофагије проузрокује неуродегенеративна оштећења, инфламацију и оштећење јетре, пропадање мишића. У неким околностима, аутофагија може бити тумор супресивна. Аутофагија може да омогући и опстанак туморских ћелија (и нормалне ћелије). У том контексту може да фаворизује настанак тумора.

Процес аутофагије зависи и од континуиране синтезе протеина и од континуираног присуства АТР-а (121, 133). У нормалним условима постоји низак ново активности аутофагије, деградације истрошених и остарелих протеина и органела. Оштећени протеини додавањем полиубиквитинског протеинског ланца дају сигнал да буду препознати од стране аутофагозома. Јединствени систем конјугације протеина сличног убиквитину и комплекс протеина који усмјерава везивање мембране и фузију на лизозому или вакуоли су важне компоненте аутофагије. У стањима стреса и гладовања аутофагија је снажна и

селективна. Постоји више сигналних путева који контролишу прелазак са базалне на интензивну аутофагију. Срж ових путева је mTOR сигнални пут. Нутрицијенти активирају mTOR који гаси формирање аутофагозома директном фосфорилацијом комплекса atg1/unc-51 кинази 1 сличан (енгл. *atg1/unc-51-like kinasa 1* – ULK1). Гладовање супримира активност mTOR, активирањем аутофагије и стварања директне повезаности између доступних нутрицијената, ћелијског раста и катаболизма. Настали продукти разградње који онда могу бити рециклирани кроз различите путеве биосинтезе, обебеђују изгладнелој ћелији преживљавање на одређени период. У случају канцерских ћелија, преживљавање им може омогућити да избегну некрозу. Услед недостатка нутритијената, неке канцерске ћелије „конзумирају“ две-трећине своје сопствене масе и остају вијабилне, задржавајући могућност да се врате на пуну величину и у стање активне пролиферације, када се једном нутрицијенти појаве (121,133). Овај спасилачки аспект аутофагије изгледа да фаворизује преживљавање канцерске ћелије и раст инципијентних тумора. Функционишући на тај начин, овај програм поспешује формирање тумора. Штавише, кључни регулатор програма аутофагије, Beclin 1, познат и као Atg6, је ВНЗ-протеин структурно сродан Bcl2 протеину који канцерске ћелије често продукују како би избегле апоптозу. Док Bcl2 регулише отварање канала у спољашњој митохондријалној мембрани, Beclin је укључен на неки начин у удруживање аутофагозома вероватно одвајањем делова мембране од ендоплазматичног ретикулума.

Постоје нека подешавања у којима су аутофагија и апоптоза међусобно повезани што је увело идеју „молекуларних прекидача“ између ова два процеса (133). Сматра се да митохондрије представљају централне органеле које интегрирају и апоптозу и аутофагију (133). Штавише, неки од истих сигнала који су укључени у апоптозу такође могу бити укључени у аутофагију. На примјер, и код апоптозе и код аутофагије постоји координирана регулација Akt (протеин киназа В) и p70S6 киназе. И други протеини који могу бити дио мреже која повезује два типа ћелијске смрти: DAPk, Beclin 1, BNIP3, HSpin1, или protymosin- α . Малигна трансформација је још једна веза између аутофагије и апоптозе (133).

Чињеница да аутофагија фаворизује преживљавање ћелија канцера и тиме стимулише онкогенезу потврђена је распрострањеном експресијом Beclin-1 протеина у извесним туморима. Рационално је да када туморске ћелије пролазе кроз трансформацију индуквану *ras* онкогеном, на пример, резултујућа промена у енергетском метаболизму ћелије, захтева активирање аутофагије да би се осигурало континуирано снабдевање нутритијентима; тиме можемо објаснити, зашто *ras*-дириговани тумори код којих је аутофагија изненада прекинута, брзо одумиру.

Корелација између смањене аутофагије и онкогенезе је такође документована. Истраживања су показала да је током онкогенезе дерегулисана трансформација неколико протеина и путева који су повезани са аутофагом сигнализацијом што доводи до смањене аутофагоцитне активности. Аутофагија се такође сматра заштитним механизмом против апоптозе. Lemasters и сарадници (134) су примијетили да се деполаризоване митохондрије, карактеристике апоптозе, брзо елиминишу аутофагијом у примарним хепатоцитима. Уклањање оштећених митохондрија спречава ослобађање про-апоптотичних супстанци из митохондрија, дакле спречава апоптозу.

У неким ћелијама и под одређеним условима морфолошке карактеристике аутофагије, могу се појавити прије апоптотске ћелијске смрти, што одговара раној фази апоптозе. Контроверза је и даље присутна, али интересовање за ово подручје аутофагне ћелијске смрти се стално повећава са појавом нових тестова и маркера за објашњење молекуларне

основе аутофагије и њене могуће импликације у програмираној ћелијској смрти и трансформацији малигнућ ћелија.

1.4.13. Атипичне ћелијске смрти

Митотичка катастрофа

Митотичка катастрофа је начин ћелијске смрти актуелна за вријеме или послеје нерегулисане/неуспјешне митозе, која се карактерише морфолошким промјенама као што је микронуклеација (што често резултира неравномјерном дистрибуцијом хромозома и фрагментата хромозома између ћелија ћерки) и мултинуклеација (присуство два или више једра, сличне или хетерогене величине, као последица дисрегулације раздвајања током цитокинезе). Међутим, не постоји широки консензус о употреби овог термина (135, 136) и митотска катастрофа може довести или до апоптотске морфологије или некрозе (135, 136). Као резултат тога, NCCD препоручује употребу термина „смрт ћелија којој претходи мултинуклеација“ или „ћелијска смрт настала током метафазе“, што је више прецизан и информативнији појам.

Аноикис

Апоптоза изазвана губитком везивања за супстрат или друге ћелије назива се аноикис (137). Осим специфичног начина индукције, молекуларни механизми аноикис-а одговарају онима активираним током класичне апоптозе (137). NCCD признаје употребу овог термина из историјских разлога, јер је већ прилично заступљен у литератури. Међутим, биће потребно одредити да ли под одређеним условима други модалитети ћелијске смрти наступају *in vivo* након одвајања од других ћелија или базалне мембране, односно постоје ли облици аноикиса рефракторни на инхибиторе каспаза.

Ексцитотоксичност

Ово је облик ћелијске смрти која се појављује у неуронима изложеним ексцитаторним аминокиселинама, као што су глутамат, што доводи до отварања N-methyl-D-aspartat Ca^{2+} пропусног канала, и цитосолног преоптерећења калцијумом и активирања леталних сигналних путева (138). Ексцитотоксичност има сличности са апоптозом и некрозом (у зависности од интензитета иницијалног стимулуса), и укључује MMP као критични догађај. Из тих разлога, и због присутности заједничких регулатора као што је сам азотни оксид (139) ексцитотоксичност се не може сматрати засебном врстом ћелијске смрти.

Параптоза

Овај термин је првобитно уведен да би се описао облик програмиране ћелијске смрти морфолошки и биохемијски различит из апоптозе (140). У више типова ћелија, параптоза је изазвана експресијом рецептора I за фактор раста сличан инсулину, и повезана је са екстензивном цитоплазматском вакуолизацијом и бубрењем митохондрија, али без икаквог другог морфолошког знака апоптозе (140). Манифестације параптозе се не могу спријечити инхибиторима каспаза, нити прекомјерном експресијом анти-апоптотичних Bcl-2 протеина (140) и наизглед је резултат сигналне каскаде која укључује специфичне чланове фамилије митоген-активираних протеин киназе (140). Тренутно је још увијек нејасно да ли параптоза представља пут смрти ћелије који се заиста разликује од свих других.

Пироптоза

Пироптоза је први пут описана у макрофагима инфицираним са *Salmonella typhimurium*. (141). Укључује апикалну активацију каспазе-1, протеазе која је углавном позната као ензим који конвертује и активира интерлеукин1b (IL-1b). Активација каспазе-1 помоћу *S. typhimurium* (и других патогена као што су *Pseudomonas aeruginosa* и *Shigella flexneri*) остварује се кроз Iraf (142-144) NLR протеин повезан са Araf-1 (145). Насупрот, пироптоза индукована леталним токсином *Bacillus anthracis*-а не захтијева Iraf и укључује други NLR протеин. Осим тога, макрофаги третирани липополисахаридом (било у присуству или у одсуству АТФ) улазе у пироптозу посредовану адапторним протеином ASC, који заједно са каспазом-1 формира супрамолекуларни цитоплазматски комплекс, такође познат као „пироптозом“ (146). Дакле, различити путеви активације каспазе-1 индукују пироптозу. Како овај облик смрти ћелије карактерише ослобађање IL-1b (који је један од главних цитокина или пирогена који изазивају грозницу) и IL-18, пироптоза може играти значајну улогу у локалној и системској инфламацији (147, 148).

2. Циљ истраживања

Основни циљ овог истраживања је структурна и биохемијска анализа и испитивање потенцијалног антитуморског ефекта новосинтетисаних комплекса цинка са дериватима тиосалицилне киселине: $[\text{Zn}(\text{S-alil-thiosal})_2]$ - $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_2\text{Zn}$ (C1) и $[\text{Zn}(\text{S-izobuten-thiosal})_2]$ - $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_2\text{Zn}$ (C2).

У складу са основним циљем постављени су сљедећи експериментални задаци:

1. Одредити састав нахрађених једињења на основу резултата елементалне микроанализе.
2. Претпоставити сруктуру добијених комплексних једињења на основу инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије.
3. Испитати интеракцију новосинтетисаних комплекса са СТ-DNA.
4. Испитати потенцијалну цитотоксичку активност комплекса на мишјим ћелијским линијама колоректаног карцинома (СТ26), меланома (B16F1) и мезенхималних матичних ћелија (mMSCs).
5. Одредити релативни однос некротске и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама.
6. Испитати утицај новосинтетисаних комплекса на ћелијски циклус туморских ћелија.

3. Материјал и методе

3.1. Продукција лиганда

SADTA (алкенил= пропенил-(L1) и изобутенил-(L2)) синтетисани су реакцијом тиосалицилне киселине и одговарајућих алкенил халогенида у алкалном раствору вода-етанол (149).

SADTA (алкенил= пропенил-(L1) и изобутенил-(L2)) су добијени реакцијом алкиловања према претходно описаној стандардизованој методи (150).

3.2. Поступак продукције комплекса

3.2.1. Продукција комплекса цинка(II) и SADTA, [Zn(S-propenyl-thiosal)₂] (C1)

Поступак синтезе комплекса је урађен по претходно описаној стандардизованој методи (156). Принос реакције: 0,22 g (61%). [Zn(S-propenyl-thiosal)₂] = ZnC₂₀H₁₈O₄S₂·2,5 H₂O (Mr = 496,906). Израчунато: C, 48,34%; H, 4,67%; S, 12,91%. Нађено: C, 46,68%; H, 4,61%; S, 12,93%.

IR (KBr, cm⁻¹): 3402s, 2924w, 1591s, 1554s, 1518s, 1506m, 1388s, 1281w, 1044w, 940w, 831w, 744m, 717w, 708m.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 3,40 (d, 4H, CH₂), 5,01-5,11 (m, 4H, CH₂), 6,01 (m, 2H, CH), 7,39-8,31 (m, 8H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 23,2 (CH₂), 118,1 (CH₂), 133,3 (CH), 125,5, 126,4, 126,9, 133,3, 134,5, 137,6 (Ar), 169,7 (COO⁻).

3.2.2. Продукција комплекса цинка(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, [Zn(S-isobutenyl-thiosal)₄] (C2)

Поступак синтезе комплекса је урађен по претходно описаној стандардизованој методи (156). Принос реакције: 0,23 g (59%).

[Zn(S-isobutenyl-thiosal)₄] = ZnC₂₂H₂₂O₄S₂·2,5 H₂O (Mr = 524,958). Израчунато: C, 50,33%; H, 5,18%; S, 12,22%. Нађено: C, 50,89%; H, 5,11%; S, 11,51%.

IR (KBr, cm⁻¹): 3437m, 3075w, 2918w, 1600s, 1581s, 1552m, 1459m, 1437m, 1405s, 1281w, 1258w, 1063w, 1044w, 896w, 743m, 696m, 655w.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 1,85 (s, 6H, CH₃), 3,50 (s, 4H, CH₂), 4,80-4,98 (m, 4H, CH₂) 7,15-7,90 (m, 8H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 22,7 (CH₃), 40,0 (CH₂), 114,0 (CH₂), 124,5, 125,4, 128,9, 131,3, 135,3, 138,6 (Ar), 141,3 (C), 171,0 (COO⁻).

3.3. Анализе и мјерења

3.3.1. Елементална микроанализа

Елементалну микроанализу (C, H, S) спровели су истраживаћи са Катедре органске хемије на Хемијском факултету Београдског Универзитета. Све анализе су урађене на машини *Vario III*.

3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

На спектрофотометру *Perkin-Elmer* Природно-математичког факултета снимљени су инфрацрвени спектри једињења, коришћењем КВг технике.

3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Помоћу спектрофотометра *Varian Gemini-200* Природно-математичког факултета Снимљен је нуклеарномагнетнорезонанциони спектар (^1H и ^{13}C) добијених једињења. Као растварач користили смо D_2O . Хемијска помјерања су су приказана према триметилсилану (TMS).

3.3.4. Спектроскопске студије апсорпције

Интеракција цинк(II) комплекса са CT-DNA проучавана је UV-Vis спектрофотометријски користећи апарат на 310K. Низ раствора припремљен је мијешањем раствора комплекса са одређеном концентрацијом (8 μM) и инкрементима основног раствора DNA (2,63 mM).

3.3.5. Флуоресцентна мјерења

Мјерења флуоресцентним гашењем спроведена су како би се утврдило да ли ови комплекси могу да премјесте EB из DNA-EB комплекса. DNA-EB раствор је првобитно припремљен мијешањем 21 μM EB и 21 μM CT-DNA у 0.01 M PBS-у (pH=7,4). Флуоресцентно гашење DNA-EB испитано је након додавања одређене количине раствора комплекса у раствор DNA-EB. Интензитет флуоресцентности измјерен је користећи RF-1501 PC спектрофлуорометру (Shimadzu, Japan) са емисијом таласне дужине од 611 nm и екситација таласне дужине на 527nm. Сваки од система је промућкан и инкубиран на собној температури. Емисија је такође снимљена у опсегу 550-750 nm.

3.3.6. Припрема раствора испитиваних комплекса

Комплекси цинка(II), C1 и C2, њихови пролиганди L1 и L2, цисплатина и оксалиплатина су прво измјерени, растворени у диметил-сулфоксиду (*DMSO*, енг. *dimethyl sulfoxide*) у концентрацији од 40 mM и филтрирани кроз филтере са промјером пора од 0,22 mm. Након тога смо испитивана једињења разблажили у комплетном медијуму, тако да финална концентрација диметил-сулфоксида мања од 0,5% (v/v). Прављене су серије разблажења у концентрацијама од 1,5 μM , 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM и 200 μM . Сви раствори који су коришћени у експериментима су припремани

искључиво на дан експеримента, како би се избјегла евентуална промјена хемијске природе тестираних једињења. Контролној популацији нетретираних ћелија је додаван медијум са истом концентрацијом диметил-сулфооксида као код ћелија третираним максималном концентрацијом испитиваних супстанци, јер је ту концентрација диметил-сулфооксида била највећа. Бланкови су били бунари којима нису додаване ћелије ни медијум.

3.4. Ћелијске културе

У студији смо испитали дејство комплекса цинка(II), *C1* и *C2*, њихових пролиганда *L1* и *L2*, цисплатине и оксалиплатине на два типа туморских ћелија: *CT26* (ћелије мишјег карцинома колоне), *B16F1* (ћелије мишјег меланома) и један тип здравих ћелија *mMSC* (мишје мезенхималне матичне ћелије). Све ћелије су купљене од „*American Type Cell Collection*“ (*ATCC, Manassas, VA, USA*). Ћелије су култивисане у комплетном медијуму који је прављен на следећи начин: *DMEM (Sigma, Germany)*, коме је додат фетални говеђи серум (10%) (*Sigma, Germany*), 1% пеницилин-стрептомицина (*Penicillin-Streptomycin, P4333, Sigma Aldrich, Germany*) и 1% неесенцијалних аминокиселина (*MEM Non-essential Amino Acid Solution (100×), M7145, Sigma Aldrich, Germany*). Ћелије су гајене у инкубатору у фласковима од 25 cm³ на апсолутној влажности и са 5% CO₂ на температури од 37°C. Свака 2-3 дана су ћелије расијаване у друге флашкове, тако да су одржаване у експоненцијалној фази раста са конфлуентношћу фласкова мањом од 90%. За подизање ћелија је коришћен трипсин који је припреман по препоруци произвођача (*Sigma, Germany*).

3.5. МТТ тест

МТТ тест је тест који се користи за испитивање вијабилности ћелија. Основни принцип овог теста је заснован на својству вијабилних, односно живих ћелија да редукују жуту со тетразолијум-бромида (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид), у једињење љубичасте боје, формаза (151). Наиме, живе ћелије садрже ензиме *NAD(P)H*-зависне оксидоредуктазе које имају ту способност, тако да што имамо већи број живих ћелија у неком раствору, то ће бити већи интензитет љубичасте боје раствора након одређеног периода инкубације. Конкретно, у сваки бунар плоче од 96 бунара је засијавано по 100 µl суспензије која садржи 3x10³ ћелија које су биле у експоненцијалној фази раста. Након 24 сата, ћелије би се залијепиле за дно микротитар плоче, па су тада третиране различитим концентрацијама (1,5 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM и 200 µM) испитиваних комплекса цинка(II), *C1* и *C2*, њихових пролиганда *L1* и *L2*, цисплатине и оксалиплатине. Свака концентрација тестираних супстанци је испитивана у трипликату и у три независна експеримента. После третмана од 24, 48 и 72 часа и туморских и здравих ћелија, из сваког бунара је вађен супернатант и по 200 µl раствора соли тетразолијум-бромида у медијуму (0,5 mg/ml) је додавано. Након 2-3 сата инкубације, поново смо вадиле супернатант из сваког бунара и додавали по 150 µl диметил-сулфооксида, да би се растворили кристали љубичастог формазана. Потом смо мјерили интензитет љубичасте боје у сваком бунару на елиза-читачу (*Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments*) читавањем апсорбанце на 595 nm. Процент вијабилних ћелија смо рачунали тако што смо дијелили вриједност очитане апсорбанце у бунару третираних ћелија са

просјечном вриједношћу апсорбанце која је измјерена у бунарима нетретираних ћелија и тако добијен однос смо множили са 100.

$$\% \text{вијабилних ћелија} = ((\text{апсорбанца третираних ћелија-бланк}) / (\text{апсорбанца нетретираних ћелија-бланк})) * 100$$

$$\% \text{цитотоксичности једињења} = 100 - \% \text{вијабилних ћелија}$$

Сви резултати цитотоксичности су приказани графички као аритметичка средина цитотоксичности испитиваних супстанци из сва три поновљена експеримента и трипликата \pm стандардна девијација (*SD*). Вриједност која редукује вијабилност третираних ћелија за 50% (*IC₅₀* вредност) је израчуната у *Microsoft Office Excel-у 2010*, преко једначине зависности вијабилности третираних ћелија од концентрације испитиване супстанце. Такође смо рачунали индексе селективности тестираних супстанци као однос *IC₅₀* вриједности неке супстанце на здравој ћелијској линији (*mMSC*) и *IC₅₀* вриједности те супстанце на туморској ћелијској линији (*CT26* или *B16F1*).

3.6. Испитивање доминантног типа ћелијске смрти проточном цитометријом

Доминантан тип ћелијске смрти који је индукован тестираним супстанцама је испитан методом проточне цитометрије и коришћењем *Annexin V/PI* бојења по препоруци произвођача (*Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) Apoptosis Kit, BD Biosciences*). Наиме, коришћене су двије боје, *Annexin V* која се везује за остатке фосфатидил-серина и једна вијабилна боја, пропидијум-јодид (*PI*). Код вијабилних ћелија које нису почеле да улазе у процес апоптозе, остаци фосфатидил-серина су окренути ка унутрашњој страни ћелијске мембране, тако да не долази до везивања *Annexin*-а *V* за остатке фосфатидил-серина. Приликом започињања процеса апоптозе, долази до извртања дјелова ћелијске мембране на спољашњу страну, тако да се за ћелије које се налазе у некој од фаза апоптозе, било ране или касне, везује *Annexin V*. Такве ћелије се на резултатима проточне цитометрије групишу као *Annexin V* позитивне ћелије. Са друге стране, *PI* је боја која се везује за једро и боја која не пролази ћелијску и друге мембране, тако да су ћелије које су на резултатима проточне цитометрије *PI* позитивне, заправо ћелије којима је компромитован интегритет ћелијске мембране. Такве ћелије се налазе или у касној фази апоптозе или су некротичне. Сматра се да су *Annexin V (-)/ PI (-)* ћелије вијабилне, *Annexin V (+)/ PI (-)* ћелије у раној фази апоптозе, *Annexin V (+)/ PI (+)* ћелије у касној фази апоптозе а да су некротичне ћелије *Annexin V (-)/ PI (+)*.

У плоче од 24 бунара је додавано по 1 ml суспензије ћелија која садржи 10^6 ћелија/ml комплетног медијума. Након 24 часа извађен је медијум, а додат је 1 ml медијума који садржи тестиране супстанце у концентрацији која одговара претходно израчунатим *IC₅₀* вриједностима. Свака супстанца је тестирана у трипликату и у три независна експеримента. Контролну популацију су чиниле ћелије којима је додаван комплетан медијум са истом концентрацијом диметил-сулфооксида као код третираних ћелија. Након 24 часа, ћелије су подигнуте трипсином, три пута „опране“ у *PBS*-у (енг. *Phosphate Buffer Saline*, фосфатни пуфер) и растворене у 100 μ l везујућег пуфера (енг. *binding buffer*). Потом смо додавали по 10 μ l *Annexin-V-FITC*-а и 20 μ l *PI*-а, инкубирали ћелије 15 минута на собној температури у мраку, додали по још 400 μ l везујућег пуфера по узорку, промијешали ћелије и читавали резултате на проточном цитометру (*FACS Calibur, BD*

Biosciences, San Jose, USA). Анализирано је најмање 15000 догађаја по узорку. Резултати су обрађени коришћењем софтвера *FlowJo vX.0.7*.

3.7. Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом

Сљедећи корак је испитивање потенцијалних ефеката комплекса цинка(II), *C1* и *C2* и цисплатине на ћелијски циклус туморских ћелија. Жељели смо да утврдимо да ли долази до промјене динамике ћелијског циклуса третираних туморских ћелија у односу на туморске ћелије које нијесу биле изложене дејству испитиваних једињења. Експерименталну групу ћелија су чиниле ћелије које су третиране концентрацијама једињења које одговарају њиховим IC_{50} вредностима, а контролну групу су чиниле нетретиране ћелије. Ћелије су засијаване у флашкове од 25 cm³. Након третмана концентрацијама једињења које одговарају њиховим IC_{50} вриједностима, ћелије су инкубиране још 24 часа, потом су трипсинизоване („подигнуте“), избројане и три пута „опране“ у *PBS*-у. У сваку епрувету је онда додато по 1 μ l *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain (Thermo Fisher Scientific, Inc.)*, а узорци су анализирани на *FACS Calibur* проточном цитометру. Анализирано је најмање 15000 догађаја по узорку. Резултати су обрађени коришћењем софтвера *FlowJo vX.0.7*.

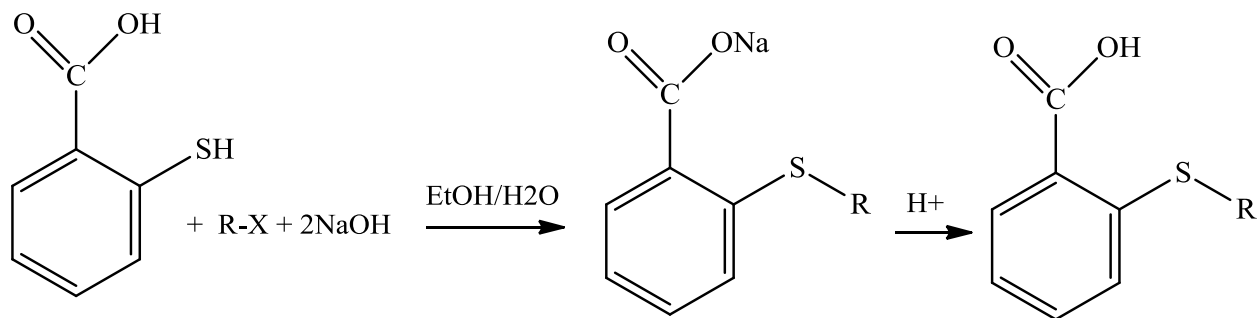
3.8. Статистичка анализа

Дистрибуција добијених података процијењена је за нормалност коришћењем Shapiro-Wilk теста. Вриједности *MTT* тестова су представљене као аритметичка средина \pm стандардна девијација (*SD*). Резултати релативног односа апоптотичних, некротичних и вијабилних ћелија су представљени као репрезентативни „dot-plot“-ови, односно „тачкасти дијаграми“ као и стубичасти дијаграми са аритметичким срединама и стандардним девијацијама добијених вриједности. Резултати ћелијског циклуса су такође представљени као аритметичка средина \pm стандардна девијација (*SD*). Сви експерименти су изведени у трипликату и три одвојена понављања. За статистичку анализу коришћена је комерцијална *SPSS* верзија 20.0 за *Windows*. Статистичка процјена је изведена Студентовим т-тестом, или једносмерна *ANOVA* зависно од дистрибуције података. *P* вредности мање од 0,05 сматране су статистички значајним.

4. Резултати

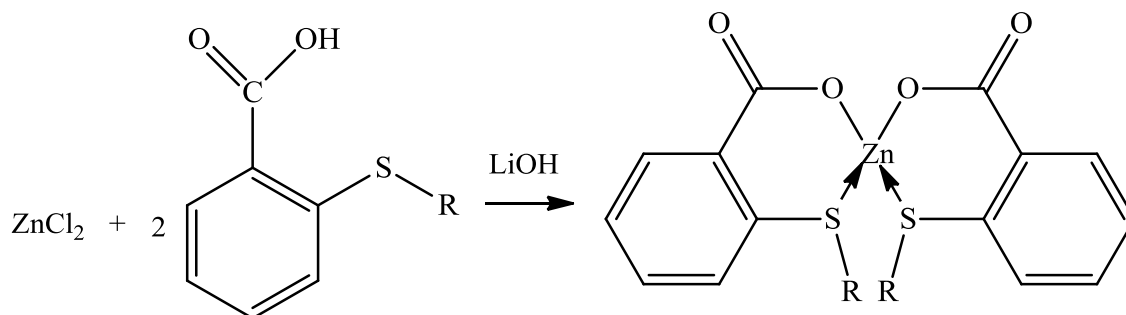
4.1. Синтеза и карактеризација ново синтетисаних комплекса Zn(II)

SADTA, гдје су R = алкенил (L1) или изобутенил (L2) настали контактом тиосалицилне киселине и одговарајућег алкил-халогенида у алкалном раствору и уз смјешу растварача вода-етанол (Графикон 3).



Графикон 3. Поступак продукције SADTA. (R = пропенил (L1) или изобутенил (L2))

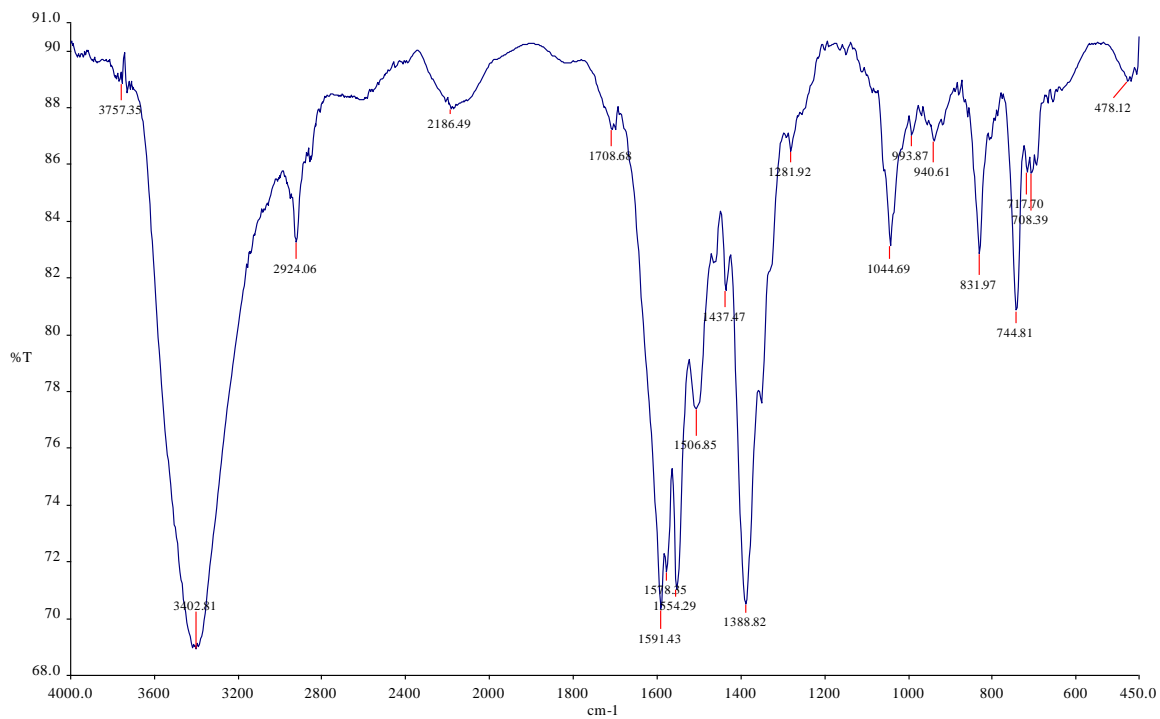
Одговарајући комплексни цинка (II) добијени су директном реакцијом $ZnCl_2$ и деривата тиосалицилне киселине (молаки однос 1:2) и уз додатак еквимоларне количине литијум-хидроксида (Графикон 4).



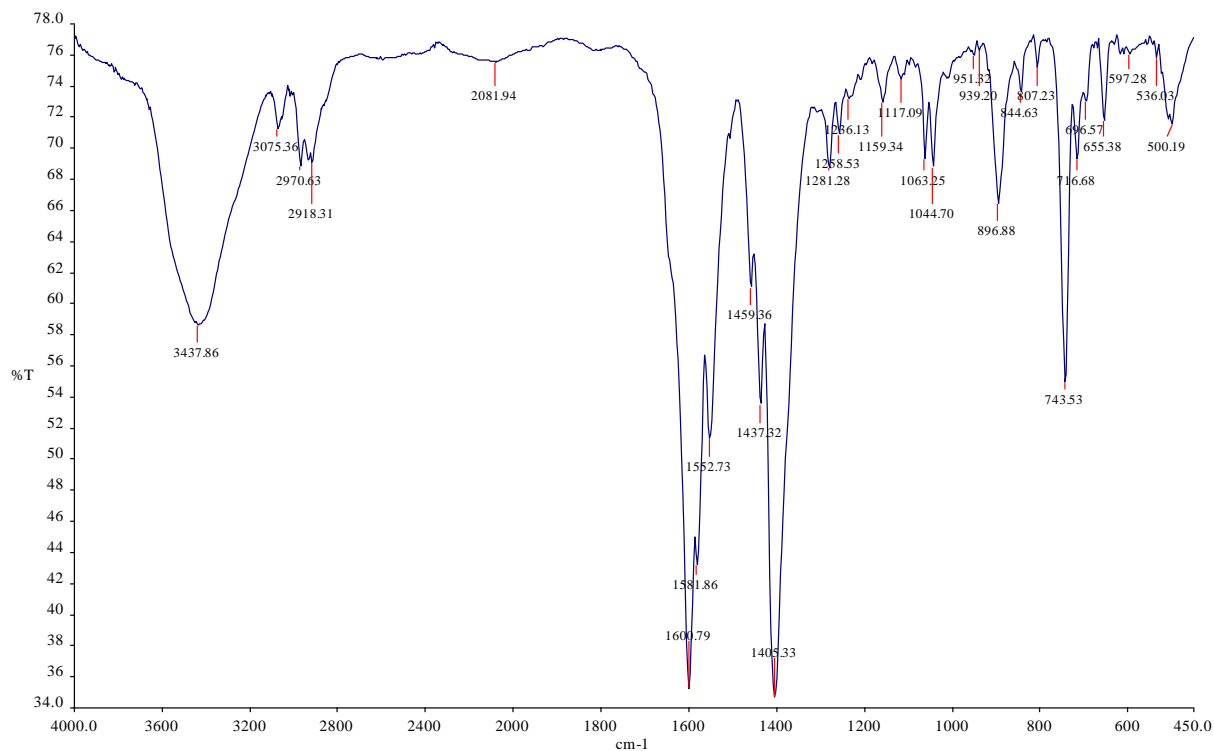
Графикон 4. Поступак продукције комплекса цинка(II) са SADTA; R = пропенил (C1) или изобутенил (C2).

Инфрацрвени спектар комплекса снимљен је како би се одредио начин координовања лиганда (Графикон 5 и 6). Очекује се бидетантна координација (S, O) ових лиганда. У IR спектрима слободних пролиганда (269), примијећене су асиметричне вибрације карбоксилних група на релативно ниским вриједностима (од 1700 до 1750 cm^{-1}), што се може приписати великим R-S група у *ortho* позицији. Позиције трака у спектрима Zn(II)

комплекса (Табела 1) потврђује депротоновање карбоксилних група. Разлика између асиметричног (1600 за (C2) и 1591 за (C1) cm^{-1}) и симетричног простирања COO^- (1405 за (C2) и 1388 за (C1) cm^{-1}) ($\Delta\nu = 195$ (C2) и 203(C1) cm^{-1}) вибрација за комплексесе указује на карбоксилат координациони модалитет. У овом случају посматрана $\Delta\nu$ вриједност већа од 200 cm^{-1} указује на монодентну везу карбоксилата (152, 153). IR спектри комплекса такође су показали широке траке на 3437 (C2) и 3402 (C1) cm^{-1} што указује на присуство молекула воде.



Графикон 5. Инфрацрвени спектар комплекса цинка(II) са SADTA



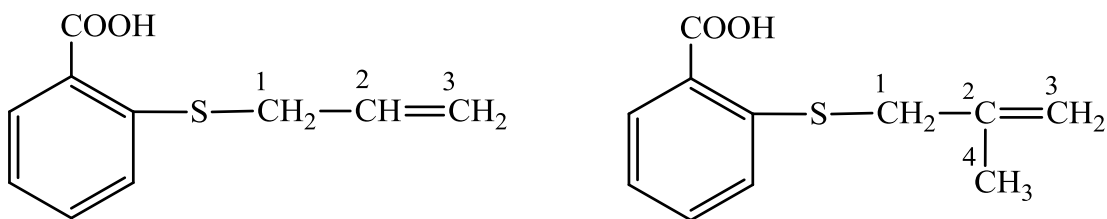
Графикон 6. Инфрацрвени спектар комплекса цинка(II) са S- изобутенил дериватима тиосалицилне киселине

Табела 1. Најзначајније траке у инфрацрвеним спектрима добијених једињења (cm⁻¹)*

Једињење	-S-R	C = O (st)	-COOH (sym, st)	COO ⁻ (st)
S-propenil-tiosal (L1)	702 (m)	1680 (s)	1415 (s)	
[Zn(S-propenyl-thiosal) ₂] (C1)	708 (m)	1591 (s)		1388 (s)
S-izobutenil-tiosal (L2)	702 (m)	1676 (s)	1412 (s)	
[Zn (S-izobutenil-tiosal) ₂] (C2)	696 (m)	1600 (s)		1405 (s)

* s = јак, m = средњи

У ¹H и ¹³C NMR спектрима, хемијска помјерања водоникових и угљеникових атома слободних S -алкенил деривата тиосалицилне киселине уочени су на скоро идентичним мјестима у као и у спектрима комплекса цинка(II). Нумерисање атома угљеника бочног ланца лиганда приказано је на Графикону 7. Незнатне разлике у хемијским помјерањима атома угљеника карбоксилне групе атома ДТА и одговарајућих комплекса Zn(II) указују да је координовање SADTA за јон цинка(II) извршено управо преко карбоксилне групе (Табела 2).



Графикон 7. Нумерисање присртних атома у оквиру молекула лиганда L1 и L2 кориштених за анализу NMR спектра

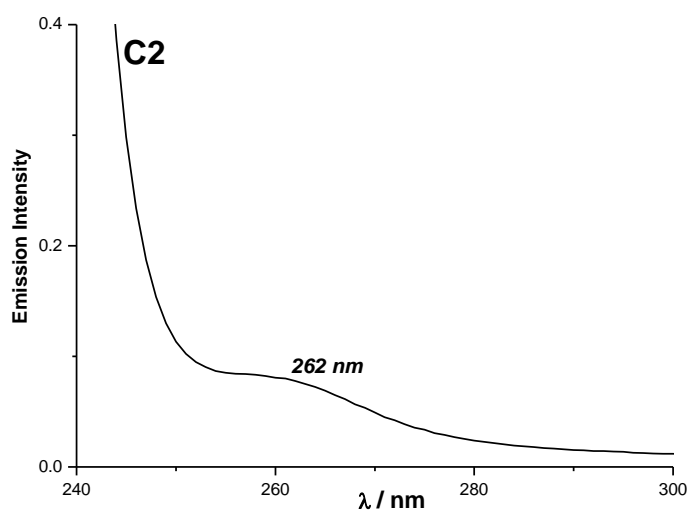
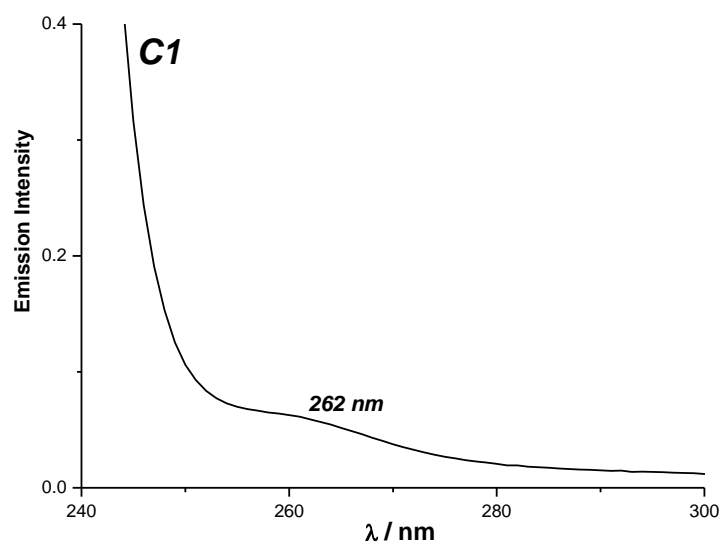
Табела 2. Хемијска померања водоникових и угљеникових атома у оквиру ^1H и ^{13}C NMR спектра слободних лиганата и одговарајућих комплекса Zn(II)

Лиганди		^1H	^{13}C	Комплекси		^1H	^{13}C
L1	C^1H_2	3,21	38,2	C1	C^1H_2	3,40	23,2
	C^2H	5,92	136,5		C^2H	6,01	133,3
	C^3H_2	4,93	115,9		C^3H_2	5.01-	118,1
	Ar	7.47-7.91	125.3-		Ar	5.11	125.5-
	COOH	-	140.1		COOH	7.39-	137.6
			172,0		8.31	169,7	
					-		
L2	C^1H_2	3,44	46,1	C2	C^1H_2	3,50	40,0
	C^2	-	142,7		C^2	-	141,3
	C^3H_2	4,98	112,1		C^3H_2	4.80-	114,0
	C^4H_3	1,82	22,5		C^4H_3	4.98	22,7
	Ar	7.42-8.30	125.0-		Ar	1,85	124.5-
	COOH	-	142.6		COOH	7.15-	138.6
			168,1			7.90	171,0
				-			

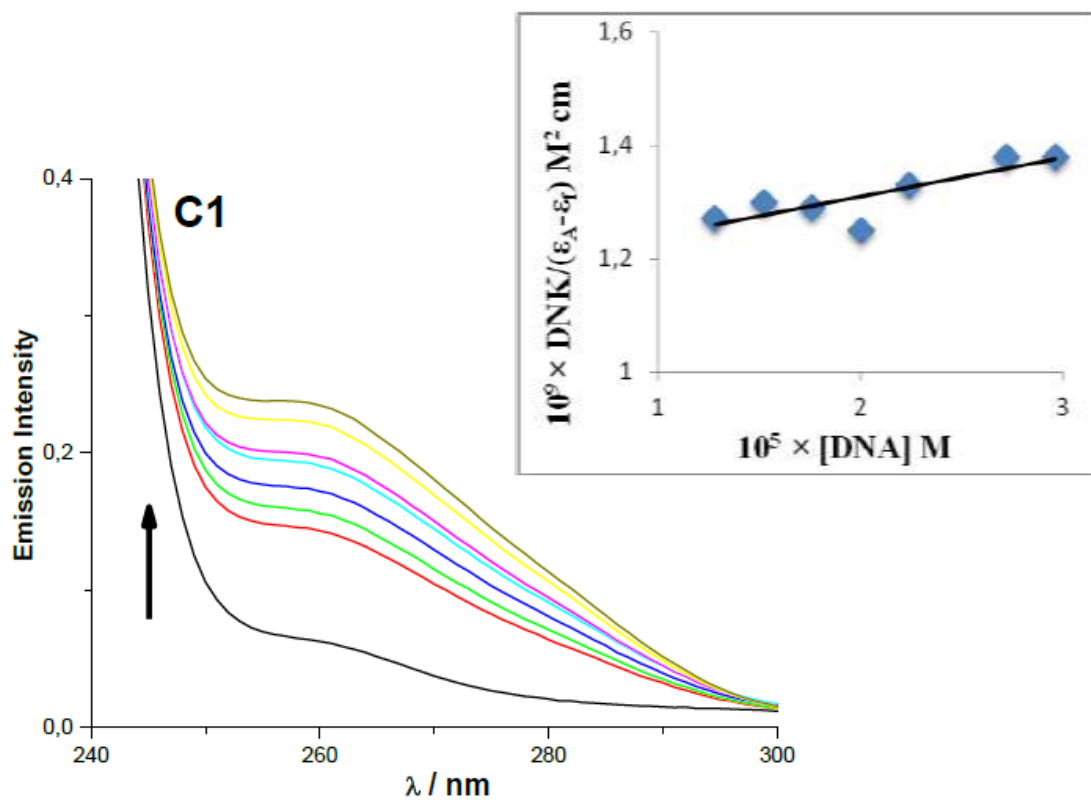
На основу резултата елементалне микроанализе, IR и NMR спектроскопије SADTA и одговарајућих комплекса Zn(II), закључујемо да су лиганди бидетантно координовани за јон Zn(II) као што се може видјети на Графикону 4.

4.2. Спектроскопске студије апсорпције

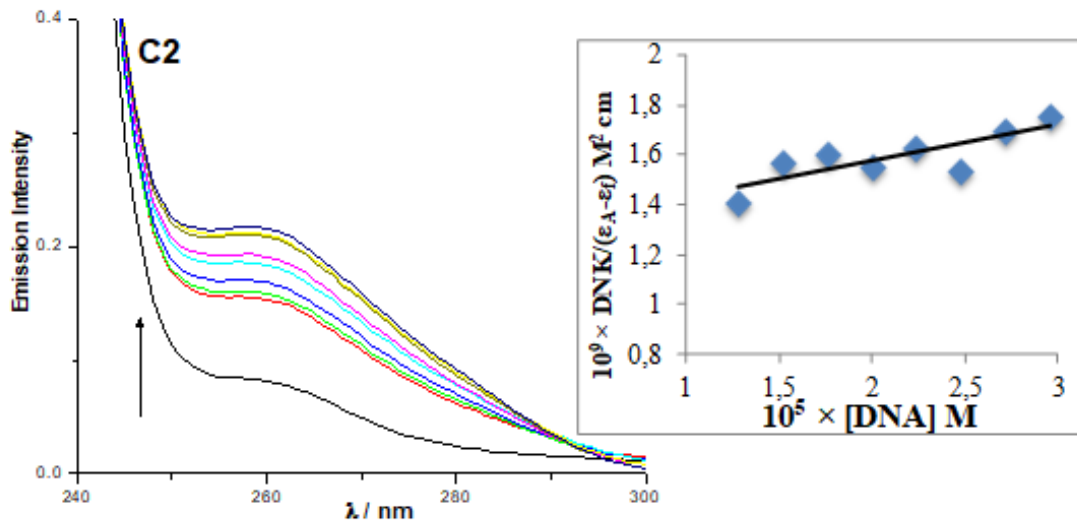
Једна од најчешће употребљаваних метода за описивање везивања комплекса метала са DNK је UV-Vis спектроскопија. Комплекси прелазних метала могу се везати за молекуле DNK путем и ковалентних (*нпр*, гуанин N7 DNK може замијенити лабилни лиганд комплекса) и/или нековалентних (интеркалацијско, електростатично или везивање на жљеб) интеракција (154). Интензитет апсорпције комплекса у присуству DNK може се смањити (хипохромизам) или повећати (хиперхромизам) уз благо повећање апсорпције таласне дужине (батохромизам). Спектар апсорпције оба Zn(II) комплекса приказан је на Графикону 8, док је спектар апсорпције комплекса C1 у присуству и одсуству СТ-DNK приказан на Графикону 9. Спектар комплекса C2 приказан је на Графикону 10.



Графикон 8. Спектри апсорбције комплекса цинка C1 и C2 у 0.01 М PBS (pH=7.4), [Zn-комплекс] = 8×10^{-6} М.



Графикон 9. Спектар апсорпције комплекса **C1** у 0.01 М PBS (рН = 7.4) након додавања СТ-DNA. $[Zn\text{-комплекс}] = 8 \times 10^{-6}$ М, $[DNA] = (0 - 2.96) \times 10^{-5}$ М. Стрелица приказује промјену апсорпције након повећања концентрације DNA. Дијаграм $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_\phi)$ vs $[DNA]$. Црна линија представља спектар комплекса у одсуству СТ-DNA.



Графикон 10. Спектар апсорпције комплекса **C2** у 0.01 М PBS (pH = 7.4) након додавања СТ-DNA. [Zn-комплекс] = 8×10^{-6} М, [DNA] = $(0 - 2.96) \times 10^{-5}$ М. Стрелица приказује промјену апсорпције након повећања концентрације DNA. Дијаграм $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ vs $[DNA]$. Црна линија представља спектар комплекса у одсуству СТ-DNA.

Прогресивно додавање СТ-DNA раствору комплекса C1 резултирало је хиперхромским ефектом уз појаву новог максимума на 262 nm, као што се види на Графикону 9. Понашање комплекса C2 било је прилично слично (Графикон 10). Хиперхромски ефекат и померање максимума указује да постоји интеракција између оба испитивана комплекса и СТ-DNA.

Константе везивања K_b (M^{-1}) за комплекс израчунате су да би се процијенила јачина ових интеракција. Вриједности K_b (M^{-1}) за комплекс израчунат једначином $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$ ([DNA] концентрација DNA док је $\epsilon_A = A_{obsd}/[комплекс]$, ϵ_f је екстинциони коефицијент некординованог комплекса и ϵ_b је екстинциони коефицијент кординованог комплекса). Добијене вредности за K_b константу су $(7,84 \pm 0,07) \times 10^3$ и $(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$ за комплекс C1 и C2 (Табела 3).

Комплекс	K_b (M^{-1})
C1	$(7,84 \pm 0,07) \times 10^3$
C2	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$

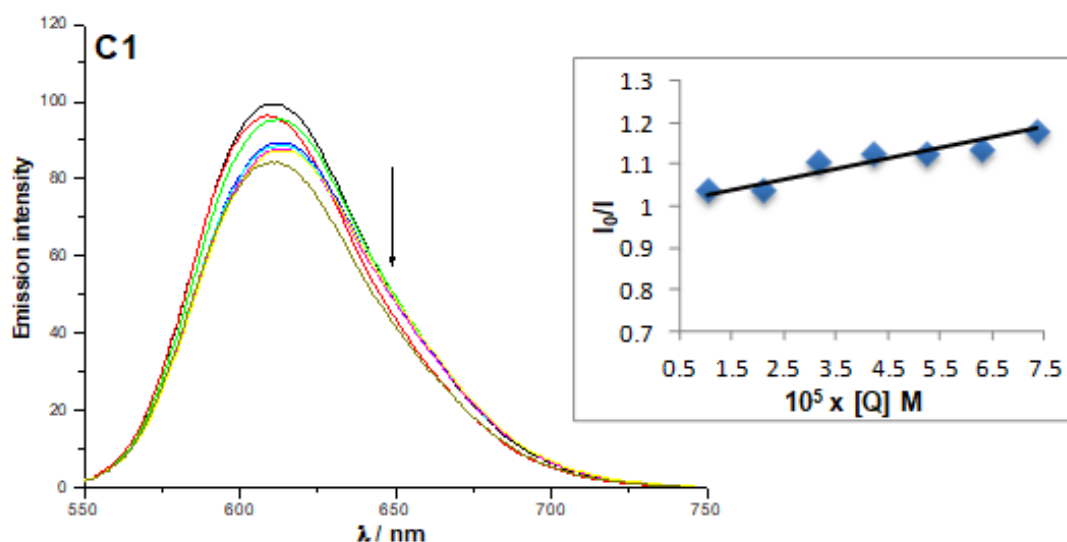
Табела 3. Добијене константе за интеракцију DNA (K_b) за оба комплекса цинка

Поређења ради, вриједност K_b за класични интеркалатор етидиум бромид (ЕВ) је $(1,23 \pm 0,07) \times 10^5 M^{-1}$ (155). Стога ови комплекси имају слабије интеракције са DNA него етидиум бромид (ЕВ). Међутим, посматране K_b вриједности сличне су онима недавно објављеним вриједностима Pt (IV) и Zn (II) комплекса са S -алкил дериватима

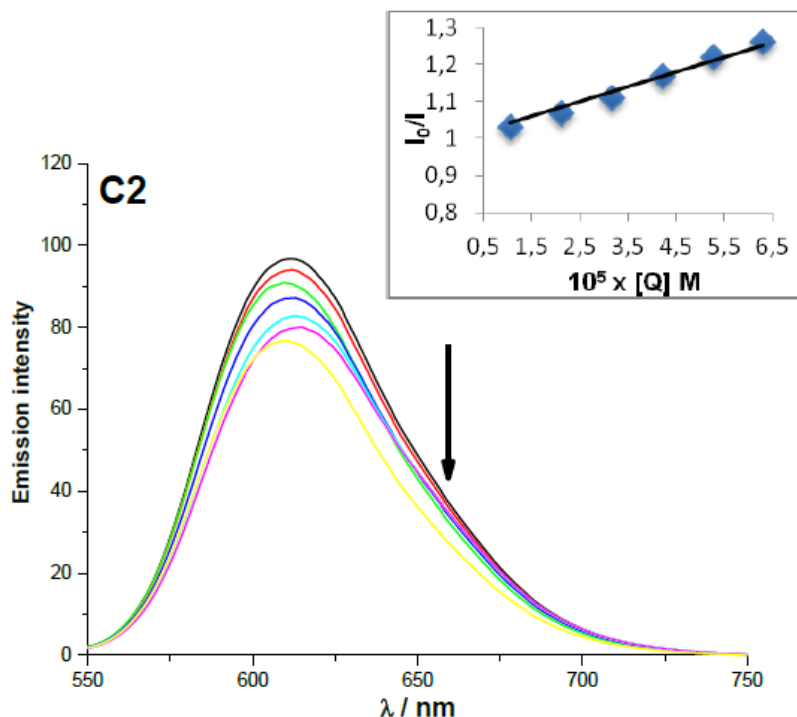
тиосалицилне киселине (156). Поређењем вриједности K_b за **C1** са одговарајућим Zn (II) комплексом са алфатичним (пропил) дериватом тиосалицилне киселине, може се видјети да се код алкенил групе афинитет ка везивању полако смањује.

Етидиум бромид је класични интеркалатор који даје значајну флуоресценцију када се дода DNA. EB флуоресцентност изазвана интеракцијом са DNA може се смањити додавањем комплекса метала који може замијенити EB из његовог DNA –EB комплекса (157). Степен интеракције комплекса и DNA израчунава се према формули: $I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$. I_0 и I представљају интензитете емисије са и без комплекса, $[Q]$ је укупна концентрација комплекса а K_{sv} је *Stern Volmer* константа.

На графиконима 11 и 12 представљена је зависност интензитета емисије EB везаног за DNA у одсуству и присуству комплекса у функцији таласне дужине за комплекс C1 и C2.. Значајно смањење интензитета емисије на 611 nm указује на конкурентну реакцију између испитиваних комплекса и између EB за везивање за DNA. Ови резултати указују на то да оба Zn(II) комплекса могу да уклоне EB из DNA-EB комплекса (158, 159).



Графикон 11. Емисиони спектри EB (21 μM) повезаног са DNA (21 μM) уз различите концентрације комплекса C1; [комплекс C1] = 0 – 73,5 μM; λ_{ex} = 527 nm. Стрелица показује интензитет промјене након повећања концентрације комплекса.: Зависност I_0/I од концентрације $[Q]$ (Q = комплекс) где су са (●) означене експериментално добијене тачке, а пуне линије представљају линеарну зависност.



Графикон 12. Емисиони спектри ЕБ ($21 \mu\text{M}$) повезаног са DNA ($21 \mu\text{M}$) уз различите концентрације комплекса **C2**; $[\text{комплекс C2}] = 0 - 73.5 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 527 \text{ nm}$. Стрелица показује интензитет промјене након повећања концентрације комплекса.: Зависност I_0/I од концентрације $[Q]$ ($Q = \text{комплекс}$) где су са (•) означене експериментално добијене тачке, а пуне линије представљају линеарну зависност.

Спектар флуоресцентне титрације анализиран је на основу Стерн-Волмер дијаграма за флуоресцентну титрацију ЕБ- DNA са испитиваним комплексима (Графикон 11 и 12). Стерн-Волмер константе (K_{sv}) израчунате су из нагиба дијаграма I_0/I наспрам $[Q]$ и имају вриједности $(2,56 \pm 0,01) \times 10^3$ и $(4,031 \pm 0,006) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ за комплекс **C1** и **C2** (Табела 4). Оба комплекса показала су умерене вриједности Стерн-Волмерове константе, што ће рећи да могу ефикасно да замијене ЕБ из DNA-ЕБ комплекса. Комплекс **C2** показује већу вриједност K_{sv} .

Комплекс	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$
C1	$(2,56 \pm 0,01) \times 10^3$
C2	$(4,031 \pm 0,006) \times 10^3$

Табела 4. Добијене Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за оба испитивана комплекса цинка

4.3. Биолошка активност комплекса цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

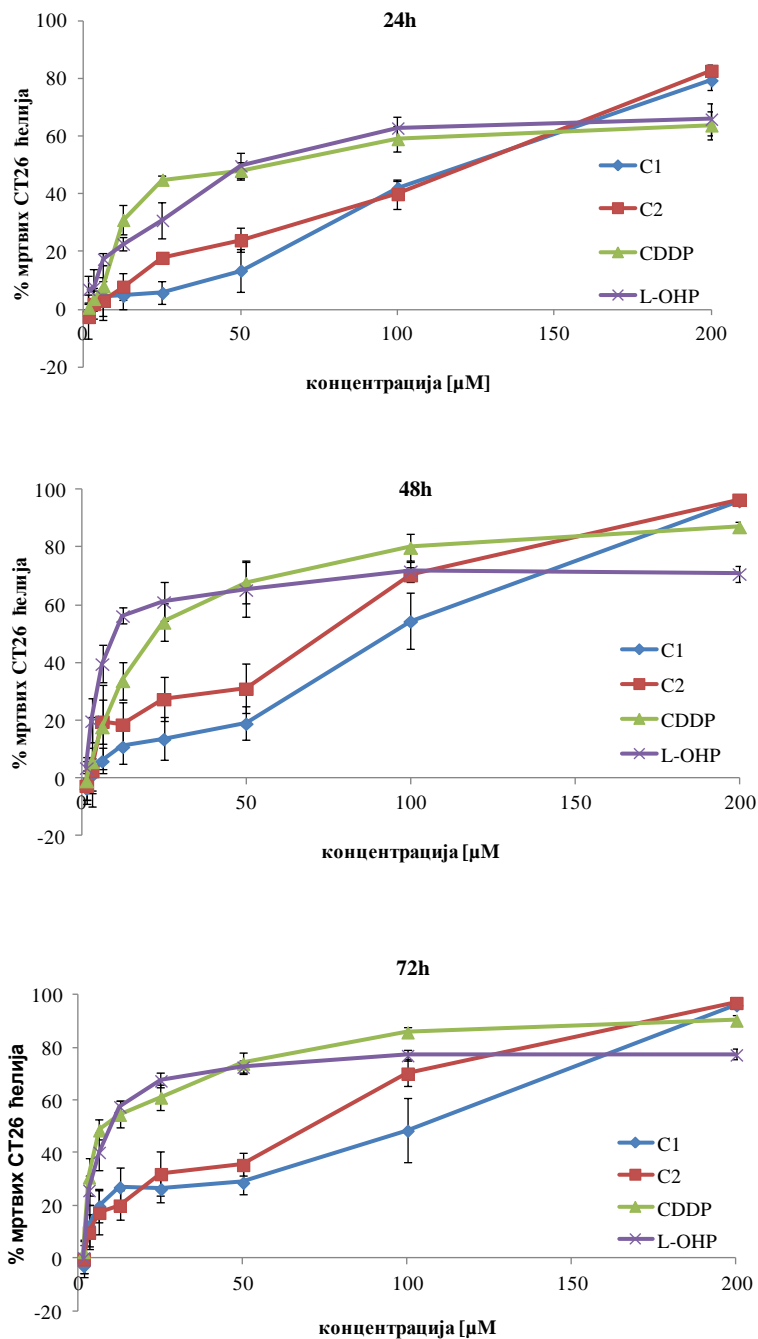
4.3.1. Цитотоксични ефекти комплекса цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Антиканцерски ефекат комплекса цинка (II) са SADTA ($[Zn(S-propenyl-thiosal)_2]$ (C1)) и комплекса цинка(II) са S-изобутенил-дериватом тиосалицилне киселине ($[Zn(S-isobutenyl-thiosal)_2]$ (C2)) и њихових одговарајућих лиганата испитивана је на малигним мишјим ћелијама колоректалног карцинома (CT26) и меланома (B16F1).

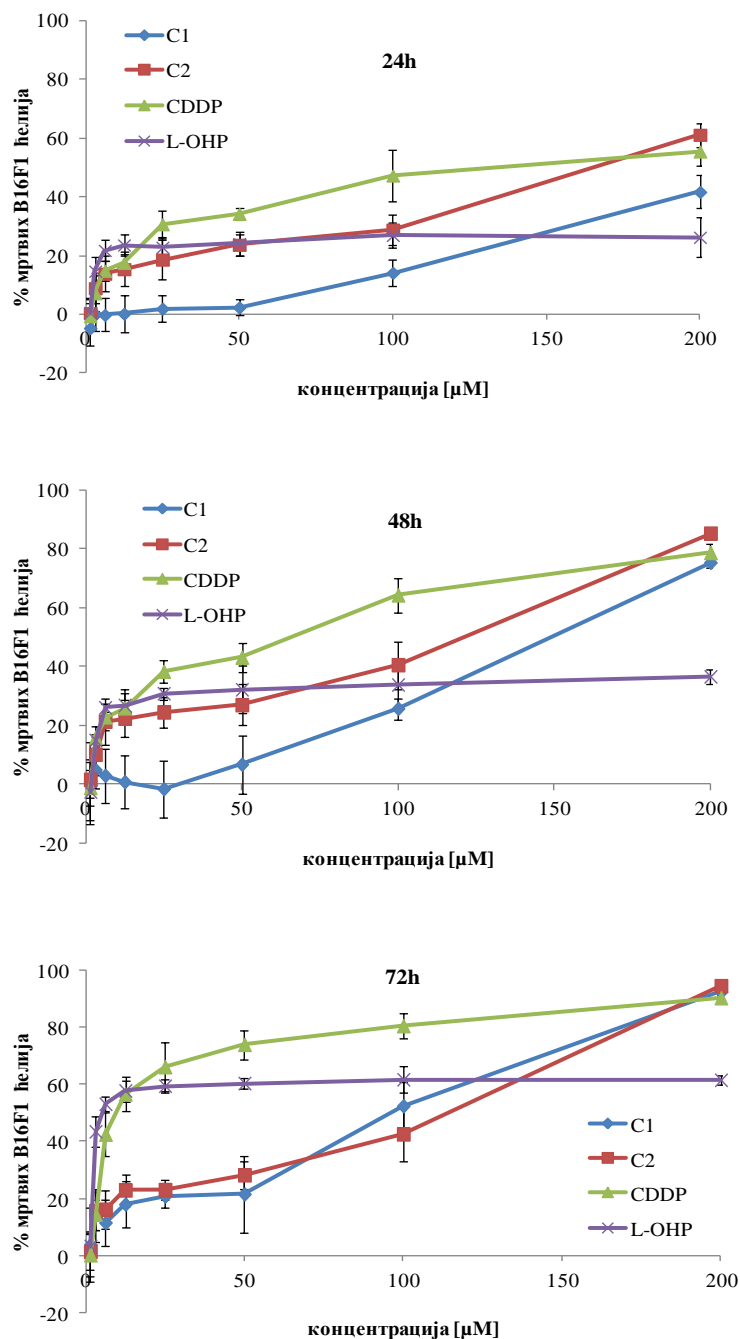
На Графикону 13 и 14 показана је осјетљивост малигнућ ћелија на токсично дејство испитиваних комплекса цинка. Јасно се уочава да је остварени цитотоксични ефекат C1 и C2 комплекса цинка(II) дозно зависан.

Након излагања ћелија мишјег карцинома колона (CT26) испитиваним комплексима у временском периоду од 24 часа, цитотоксични потенцијал C1 и C2 комплекса је приближно једнак (Графикон 13). Међутим, продужавањем инкубационог периода (48 и 72 часа) јасно се уочава снажнији цитотоксични потенцијал комплекса C2 у односу на комплекс C1 у концентрацијама од 100 μ M и мањим. Поредићи забиљежене токсичне ефекте комплекса цинка(II) на CT26 малигним ћелијама са референтним цитостатицима на бази метала – цисплатином и оксалиплатином- уочава се да су остварени ефекти C1 и C2 комплекса слабији. Међутим, цитотоксични ефекат испитиваних комплекса у највећим концентрацијама (200 μ M) већи је од ефекта оствареног након третмана референтним цитостатицима. Овај ефект примијећен је након 24 часовне инкубације а задржава се кроз вријеме.

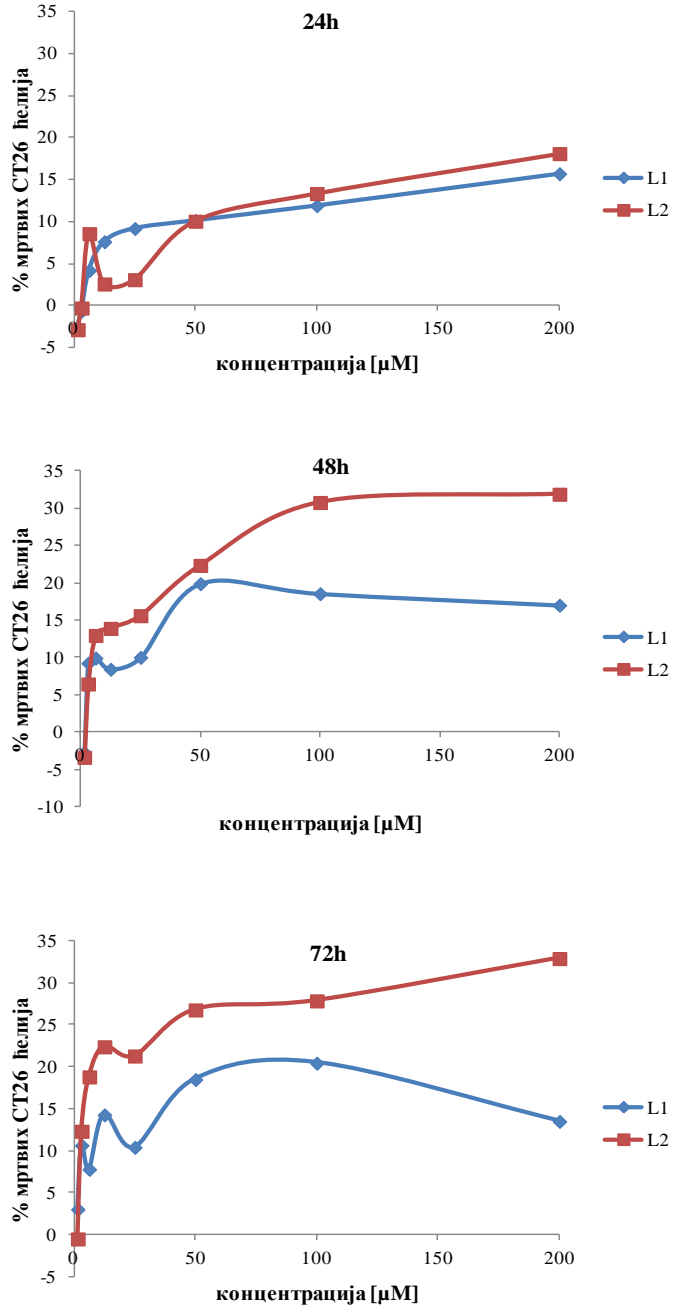
На Графикону 14 уочава се да испитивани комплекс цинка (II) C2 у већој мјери повећава број мртвих ћелија меланома миша (B16F1) у поређењу са комплексом C1. Овај феномен је забиљежен у свим испитиваним концентрацијама комплекса и то након инкубационог периода од 24 часа и 48 часова. Након излагања B16F1 ћелија новоиспитиваним комплексима у току инкубационог периода од 72 часа- разлика у цитотоксичном ефекту комплекса C2 и C1 се губи, и њихов цитотоксични ефекат постаје приближно једнак (Графикон 14). Поредињем оствареног антитуморског ефекта испитиваних комплекса цинка са референтним цитостатицима јасно се види да је цитотоксичност комплекса мања у концентрацијама од 100 μ M и мањим. Међутим, у највећој испитиваној концентрацији цитотоксичност оба новоиспитивана комплекса цинка(II) је већа или приближна оној која је остварена након излагања ћелија мишјег меланома цисплатини или оксалиплатини. Након инкубационог периода од 24 часа и 48 часова комплекс C2 у концентрацији од 100 μ M показује већи токсични ефекат на B16F1 ћелије у поређењу са оксалиплатином.



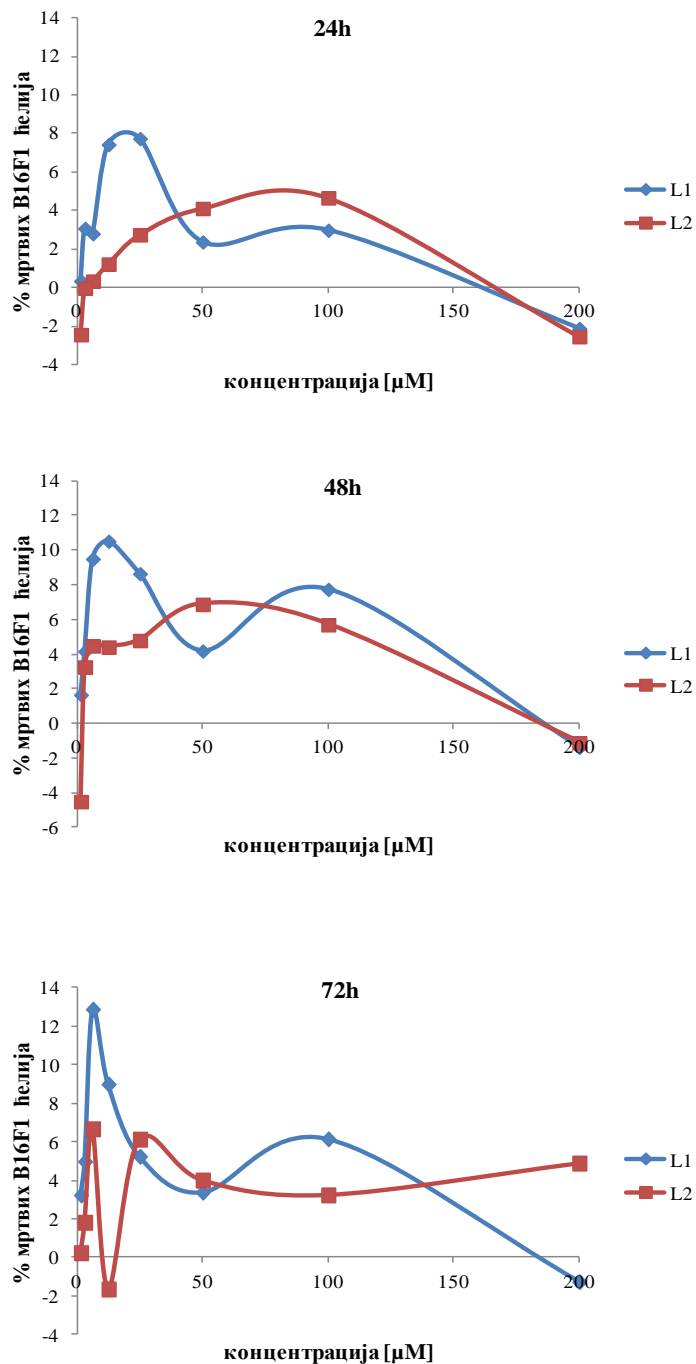
Графикон 13. Комплекси цинка са *SADTA* редукују вијабилност СТ26 ћелија на дозно зависан начин. Цитотоксични ефекат комплекса цинка(II) са Спропенил- *SADTA* ($[Zn(S\text{-}propenyl\text{-}thiosal)_2]$ (C1)), комплекса цинка(II) са изобутенил- *SADTA* ($[Zn(S\text{-}isobutenyl\text{-}thiosal)_2]$ (C2)), цисплатине (CDDP) и оксалиплатине (L-OHP) одређен је МТТ тестом након излагања СТ26 ћелија испитиваним супстанцама у временском интервалу од 24, 48 и 72 сата. Сви експерименти рађени су у трипликату, а резултати оствареног цитотоксичног ефекта приказани су као средња вриједност±стандардна девијација.



Графикон 14. Дозно зависни цитотоксични ефекат комплекса цинка са *SADTA* на линији ћелија мишјег меланома **V16F1**. Цитотоксични ефекат комплекса цинка(II) са *S*-пропенил-дериватом тиосалицилне киселине ($[Zn(S\text{-propenyl-thiosal})_2]$ (**C1**)), комплекса цинка(II) са *S*-изобутенил-дериватом тиосалицилне киселине ($[Zn(S\text{-isobutenyl-thiosal})_2]$ (**C2**)), цисплатине (CDDP) и оксалиплатине (L-OHP) одређен је МТТ тестом након излагања V16F1 ћелија испитиваним супстанцама у временском интервалу од 24, 48 и 72 сата. Сви експерименти рађени су у трипликату, а резултати оствареног цитотоксичног ефекта приказани су као средња вриједност ± стандардна девијација.



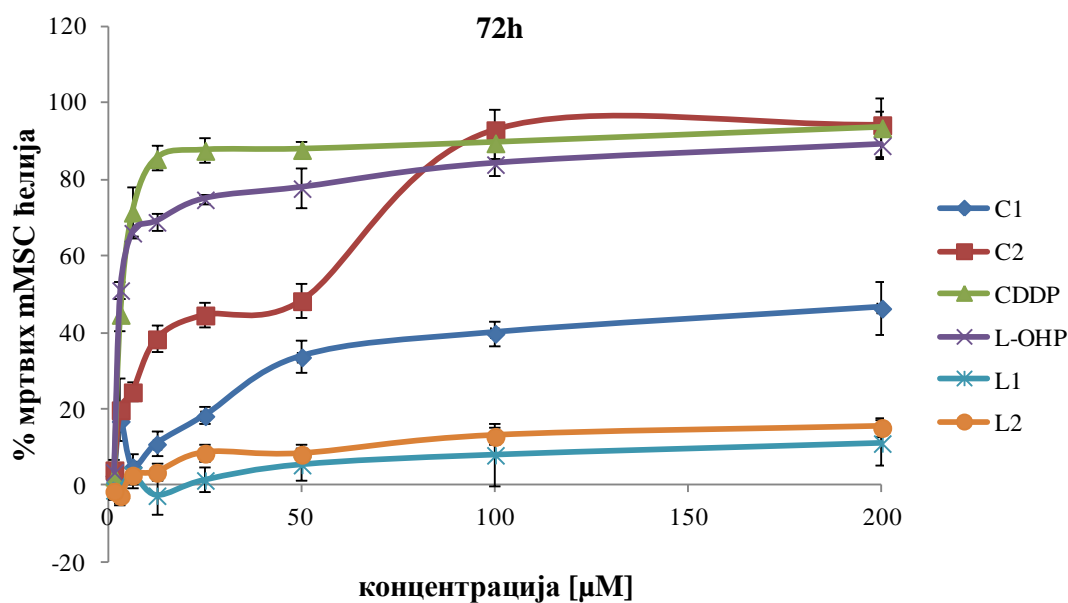
Графикон 15. Цитотоксични ефекат одговарајућих лиганата - *S*-алкенил деривата тиосалицилне киселине на линији ћелија мишјег карцинома колона СТ26. Цитотоксични ефекат *S*-пропенил-деривата тиосалицилне киселине (L1) и *S*-изобутенил-деривата тиосалицилне киселине (L2) одређен је МТТ тестом након излагања СТ26 ћелија испитиваним супстанцама у временском интервалу од 24, 48 и 72 сата. Сви експерименти рађени су у трипликату, а резултати оствареног цитотоксичног ефекта приказани су као средња вриједност±стандардна девијација.



Графикон 16. Цитотоксични ефекат одговарајућих лиганата - *S*-алкенил деривата тиосалицилне киселине на линији ћелија мишјег меланома V16F1. Цитотоксични ефекат *S*-пропенил-деривата тиосалицилне киселине (L1) и *S*-изобутенил-деривата тиосалицилне киселине (L2) одређен је МТТ тестом након излагања V16F1 ћелија испитиваним супстанцама у временском интервалу од 24, 48 и 72 сата. Сви експерименти рађени су у трипликату, а резултати оствареног цитотоксичног ефекта приказани су као средња вриједност±стандардна девијација.

Поред цитотоксичног ефекта испитиваних комплекса цинка (II), у наредним експериментима испитан је токсични ефекат њихових одговарајућих лиганата S-алкенил-деривата тиосалицилне киселине и S-изобутенил-деривата тиосалицилне киселине (L1 и L2) на ћелијским линијама мишијег карцинома колона и меланома (Графикон 15 и 16). Уочава се да лиганди самостално посједују слабу цитотоксичну активност. У случају третираних СТ26 ћелија у три различита времена инкубације у присуству лиганата L1 и L2 може се уочити да лиганди показују слаб цитотоксички капацитет који је дозно зависан (Графикон 15). Као и у случају одговарајућих комплекса цинка(II), лиганд L2 редукује вијабилност СТ26 ћелија у већој мјери него лиганд L1. Максимални остварени ефекат уочава се након инкубационог периода од 72 часа у присуству L2 лиганда који редукује вијабилност ћелија мишијег карцинома колона за око 35%. Међутим, интересантно је да на ћелијској линији мишијег меланома В16F1 редукација вијабилности која је остварена након третирања одговарајућим лигандима није дозно зависна и значајно је мања од оне која је остварена на ћелијама мишијег карцинома колона. Максимални остварени ефекат је око 14% мртвих В16F1 ћелија након инкубационог периода од 72 часа. На Фигури 4 се јасно уочава да лиганди повећавају проценат мртвих В16F1 ћелија у концентрацијском рангу од 3,125 μ М до 100 μ М, док токсични ефекат изостаје при најмањим и највећим концентрацијама, осим у случају лиганда L2 који након 72 часа у концентрацији од 200 μ М редукује вијабилност ћелија за свега 6 %.

Цитотоксични ефекат испитиваних комплекса цинка(II) и њихових одговарајућих лиганата на мезенхималним матичним ћелијама одређен је МТТ тестом (Графикон 17). Јасно се уочава да деривати тиосалицилне киселине (L1 и L2) самостално драстично не редукују вијабилност MSC ћелија. Очекивано, остварени цитотоксични ефекат референтних цитостатика на бази метала је дозно зависан и подједнак ефектима које ови лекови остварују на малигним ћелијским линијама. На Графикону 17 се јасно уочава да комплекс цинка(II) C2 редукује вијабилност MSC ћелија на дозно зависан начин и овај ефекат је приближно једнак цитотоксичном ефекту референтних једињења, цисплатине и оксалиплатине, у концентрацијама од 100 μ M и већим. Овакав резултат указује на то да комплекс цинка(II) C2 показује већу цитотоксичну активност али мању селективност па би његова примјена највјероватније била праћена већим бројем нежељених дејстава. Насупрот томе комплекс цинка(II) C1 у мањој мјери редукује вијабилност MSC ћелија у поређењу са комплексом цинка(II) C2 као и у поређењу са референтним цитотоксичним њковима на бази метала (Графикон 17). Јасно се уочава да чак и у највећим концентрацијама комплекс цинка(II) C1 редукује вијабилност MSC ћелија за мање од 50%, док је у истим условима уочено смањење вијабилности малигнућ ћелија од чак 100% (Графикон 13 и 14). Овакав резултат указује да је комплекс цинка(II) C1 високо селективан према малигним ћелијама па би његова системска примјена могла бити праћена мањом учесталошћу нежељених дејстава.



Графикон 17. Токсични ефекат комплекса цинка са SADTA на мезенхималним матичним ћелијама. Цитотоксични ефекат комплекса цинка(II) са пропенил- SADTA ($[\text{Zn}(\text{S-propenyl-thiosal})_2]$ (C1)), комплекса цинка(II) са изобутенил- SADTA ($[\text{Zn}(\text{S-isobutenyl-thiosal})_2]$ (C2)), цисплатине (CDDP), оксалиплатине (L-OHP), S-пропенил-деривата тиосалицилне киселине (L1) и S-изобутенил-деривата тиосалицилне киселине (L2) одређен је МТТ тестом након излагања мезенхималних матичних ћелија испитиваним супстанцама у временском интервалу од 72 сата. Сви експерименти рађени

су у трипликату, а резултати оствареног цитотоксичног ефекта приказани су као средња вриједност±стандардна девијација.

Затим су на основу резултата МТТ теста одређене IC₅₀ вриједности (Табела 5). У случају третирањих СТ26 и В16F1 ћелија комплексом С1 цинка(II) уочава се скромна цитотоксична активност након 72 часа инкубације што се огледа у IC₅₀ вриједностима (92,9μМ и 99,6μМ) које су веће 6 до 8 пута него IC₅₀ вриједности забележене за цисплатину и оксалиплатину при истим условима. Увидом у IC₅₀ вриједности које су добијене за овај комплекс након различитих времена инкубације уочава се цитотоксични ефекат који у мањој мјери временски зависан. Такође комплекс С1 показује врло низак токсични ефекат на мезенхималним матичним ћелијама што се огледа у IC₅₀ вриједности која је већа од 200μМ. Скроман временски зависан цитотоксични ефекат уочен је и поређењем IC₅₀ вриједности комплекса цинка(II) С2. Испитвани комплекс цинка(II) С2 значајно редукује вијабилност ћелија мишијег карцинома колона и меланома након инкубационог периода од 72 часа што се огледа у репрезентативним IC₅₀ вриједностима од 81,9μМ и 98,6μМ. Међутим, остварени токсични ефекат је и даље 5 до 8 пута мањи у поређењу са оним који је забележен за цисплатину и оксалиплатину у истим условима. Интересанто је да комплекс цинка(II) С2 под истим условима значајно редукује вијабилност мезенхималних матичних ћелија што се огледа у забележеној IC₅₀ вриједности од 22,9μМ. Иако је цитотоксични ефекат комплекса С2 у свим временским тренуцима и на свим ћелијским линијама бољи од ефекта забележеног након третмана комплексом С1, висока токсичност на мезенхималним матичним ћелијама указује на мању селективност овог једињења што би могло бити праћено већим бројем нежељених дејства.

Једињење (μМ)	Линије ћелија						
	СТ26			В16F1			mMSCs
	IC ₅₀ (24h)	IC ₅₀ (48h)	IC ₅₀ (72h)	IC ₅₀ (24h)	IC ₅₀ (48h)	IC ₅₀ (72h)	IC ₅₀ (72h)
C1	127,3 ± 7,2	101,9 ± 8,9	92,9 ± 7,9	> 200	147,2 ± 11,9	99,6 ± 8,9	> 200
C2	119,2 ± 9,6	85,8 ± 11,3	81,9 ± 8,6	161,9 ± 9,6	108,6 ± 11,3	98,6 ± 8,4	22,9 ± 1,7
CDDP	61,2 ± 7,8	24,5 ± 4,3	11,8 ± 3,1	148 ± 7,2	45,5 ± 7	15 ± 4,2	1,8 ± 0,9
L-OHP	59,1 ± 4,8	19,8 ± 4,7	15 ± 2,9	> 200	> 200	17,4 ± 3,7	2,1 ± 1
L1	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
L2	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

Табела 5. IC₅₀ вриједности комплекса цинка(II) са пропенил- SADTA ([Zn(S-propenyl-thiosal)₂] (**C1**)), комплекса цинка(II) са изобутенил- SADTA ([Zn(S-isobutenyl-thiosal)₂] (**C2**)), одговарајућих лиганата (L1 и L2) цисплатине (CDDP) и оксалиплатине (L-OHP) након третмана од 24, 48 и 72 часа. Концентрације које инхибирају преживљавање

одговарајућих ћелија за 50% одређене су на основу резултата МТТ теста. Резултати су приказани као средња вриједност±стандардна девијација.

У наредним експериментима додатно је потврђена селективност комплекса цинка(II) (Табела 6). Селективност је приказана кроз индекс селективности који је изначунат поређењем IC_{50} вриједности остварених за мезенхималне матичне ћелије и одговарајућу линију малигних ћелија. Највећа селективност према туморским ћелијама карцинома колона и меланома забиљежена је за комплекс цинка(II) C1 након инкубационог периода од 72 часа са индексом селективности од $2,15\mu\text{M}\pm 0,2\mu\text{M}$ односно $2,00\mu\text{M}\pm 0,17\mu\text{M}$ (Табела 6). Комплекс цинка(II) C2 показао је значајно мању селективност у односу на комплекс C1 према туморским ћелијама карцинома колона и меланома, $0,27\mu\text{M}\pm 0,03\mu\text{M}$ односно $0,23\mu\text{M}\pm 0,03\mu\text{M}$ након 72 часа. И један и други испитивани комплекс показују бољу селективност у односу на референтне цитостатике на бази метала (Табела 6). Иако је директни цитотоксични ефекат комплекса цинка(II) C1 значајно слабији у односу на комплекс C2 и референтне цитостатике на бази метала, овај комплекс показује највећу селективност што може указивати на најмањи број остварених нежељених дејстава у *in vivo* условима.

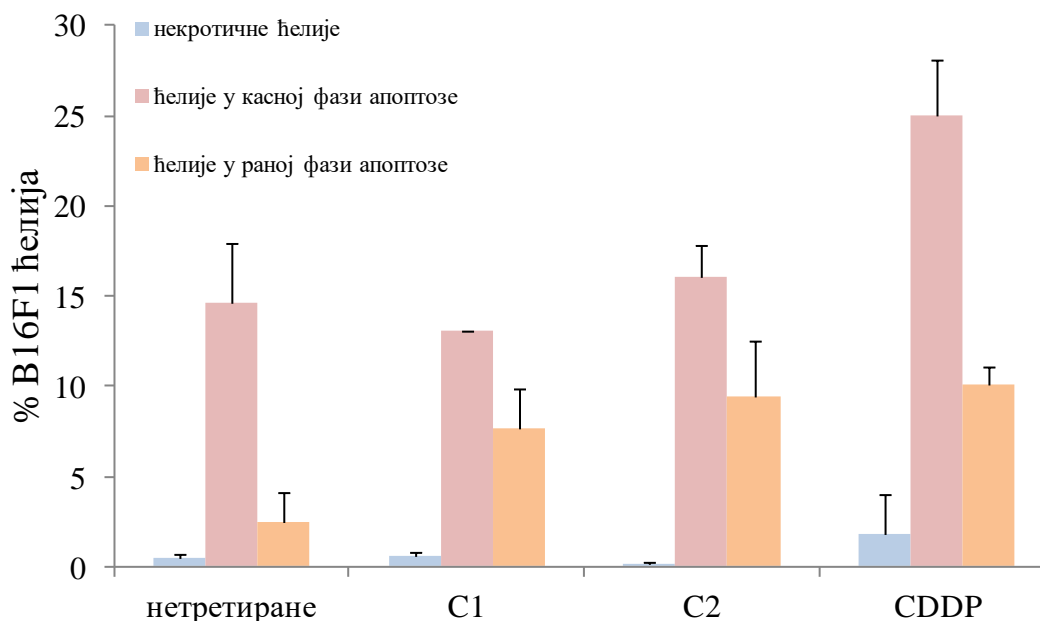
Једињење (μM)	IC_{50} (mMSCs) / IC_{50} (туморске ћелије)	
	CT26	B16F1
C1	$>2,15 \pm 0,2$	$>2 \pm 0,17$
C2	$0,27 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,03$
CDDP	$0,15 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,09$
L-OHP	$0,14 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,07$

Табела 6. Индекси селективности комплекса цинка(II) са пропенил- SADTA ([Zn(S-propenyl-thiosal)₂] (C1)), комплекса цинка(II) са изобутенил- SADTA ([Zn(S-isobutenyl-thiosal)₂] (C2)), цисплатине (CDDP) и оксалиплатине (L-OHP). Индекси су израчунати на основу односа претходно добијених IC_{50} вриједности за различите ћелијске линије. Резултати су приказани као средња вриједности±стандардна девијација.

4.4. Утицај комплекса цинка(II) са SADTA на апоптозу туморских ћелија

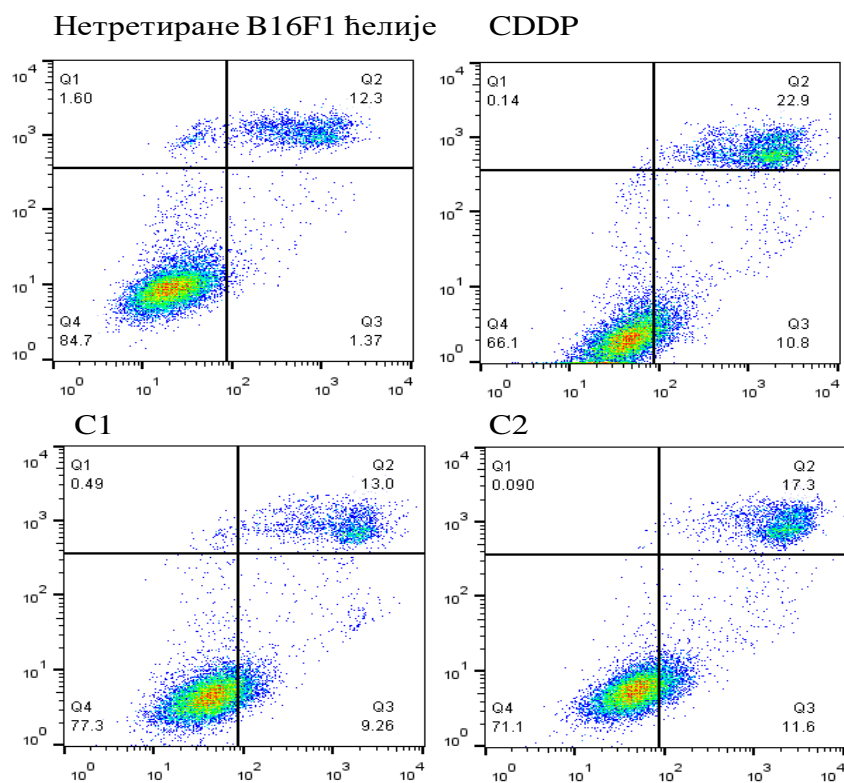
Сљедећи циљ је био да се испита на који начин комплекси цинка(II) са *S*-алкенил дериватима тиосалицилне киселине остварују претходно утврђен директан цитотоксични ефекат. У ту сврху сви наредни експерименти спроведени су на мишјим ћелијама меланома (B16F1).

Као што је познато већина цитотоксичних љекова који се користе у пракси има способност да индукује апоптозу, што је најчешће само један од механизма којима ови љекови остварују своје дејство, детерминација способности комплекса цинка(II) са SADTA у индукцији апоптозе је била сљедећи циљ овог истраживања. Након излагања туморских ћелија меланома миша испитиваним C1 и C2 комплексима цинка(II) или цисплатини у одговарајућим IC₅₀ концентрацијама, ћелије су обиљежене анексином и пропидијум јодидом и испитивана је заступљеност ћелија у фазама апоптозе.



Фигура 18. Комплекси цинка са *S*-алкенил дериватима тиосалицилне киселине повећавају проценат ћелија у раним фазама апоптозе. Заступљеност B16F1 ћелија у различитим фазама апоптозе анализирана је проточном цитометријом. Након што су B16F1 ћелије третиране комплексом цинка(II) са пропенил- SADTA ([Zn(S-propenyl-thiosal)₂] (C1)), комплексом цинка(II) са изобутенил- SADTA ([Zn(S-isobutenyl-thiosal)₂] (C2)) и цисплатином (CDDP) у концентрацијама које одговарају израчунатим IC₅₀ вриједностима, ћелије су обиљежене *Annexin*-ом V и PI. Сви експерименти рађени су у трипликату, а резултати оствареног ефекта приказани су као средња вредност±стандардна девијација.

На Графикону 18 се јасно уочава да комплекси цинка(II), као и цисплатина, повећавају проценат V16F1 ћелија у раним фазама апоптозе. Насупрот томе, највећи проценат малигних ћелија у касној фази апоптозе забиљежен је након третмана цисплатином. Такође највећи проценат некротичних ћелија, 1,77%, забиљежен је након третмана цисплатином. Регистује се да је C1 комплекс цинка(II) индуковао повећање процентуалне заступљености ћелија у раној апоптози у поређењу са нетретираним ћелијама и то око 3 пута, 7,67% наспрам 2,53%. Међутим, третман овим комплексом није мијењао проценат малигних ћелија касне апоптозе у поређењу са нетретираним ћелијама (13,05% наспрам 14,65%). Други испитивани комплекс цинка(II) C2 такође је индуковао повећање процента малигних ћелија у раним фазама апоптозе у односу на нетретираним ћелијама (13,05% наспрам 14,65%). Остварени ефекат комплекса C2 био је приближно исти оствареном ефекту цисплатине на заступљеност ћелија у раним фазама апоптозе. Такође у поређењу са нетретираним ћелијама благо повећање процента малигних ћелија у касној фази апоптозе забиљежено је након третмана комплексом C2 међутим ово повећање није достигло статистичку значајност а било је готово дупло мање у поређењу са ефектом који је забиљежен након третмана цисплатином.



Графикон 19. Репрезентативни дот плотови V16F1 туморских ћелија после 24. часовног излагања комплексу цинка(II) са пропенил- SADTA ($[Zn(S-propenyl-thiosal)_2]$ (C1)), комплексу цинка(II) са изобутенил- SADTA ($[Zn(S-isobutenyl-thiosal)_2]$ (C2)) и цисплатини (CDDP).

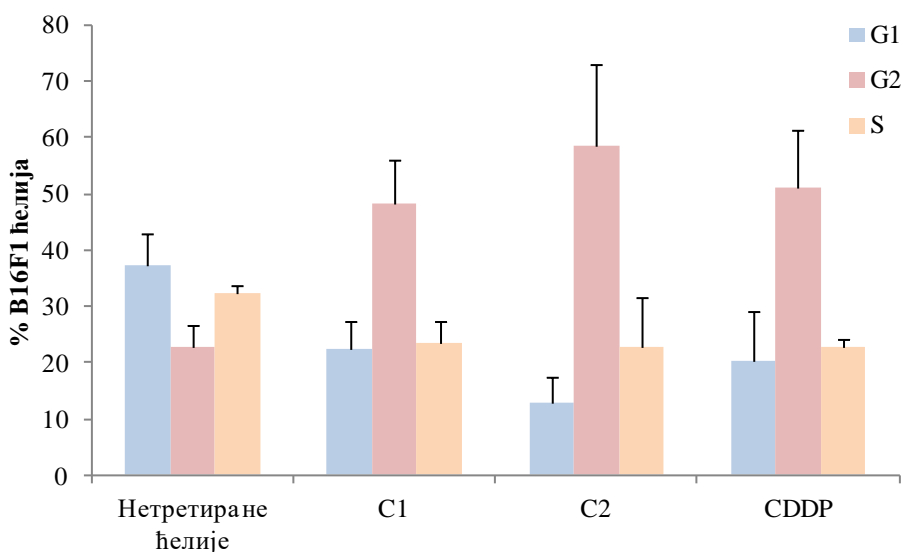
Комплекси цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине индукују апоптозу мишићних ћелија меланома са незнатним порастом процента некротичних ћелија.

4.5. Комплекси цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине индукују застој ћелијског циклуса у G2 фази

Заустављање ћелијског циклуса је од важности у антитуморској одбрани сходно томе да малигне ћелије неплански пролиферишу. С циљем да се подобније испита механизам цитотоксичног капацитета комплекса цинка(II) са SADTA детерминисан је профил ћелијског циклуса након излагања ћелија меланома миша испитиваним комплексима или цисплатини. Малигне ћелије излагане су испитиваним једињењима у временском интервалу од 24 часа у концентрацијама које одговару претходно детерминисаним IC₅₀ вредностима.

На Графикону 20 јасно се уочава да комплекси цинка(II) са SADTA индукују застој ћелијског циклуса у G2 фази слично као и цисплатина. Након излагања малигних ћелија комплексу цинка(II) C1 проценат ћелија у G2 фази је дуплиран у односу на нетретирание ћелије (48,43% наспрам 22,75%), што је праћено смањењем процента ћелија у G1 и S фази ћелијског циклуса. Такође, комплекс цинка(II) C2 повећава проценат ћелија у G2 фази за око 2,6 пута у односу на нетретирание ћелије (58,4% наспрам 22,75%). Ово повећање је слично ономе које остварује цисплатина али је такође знатно веће у односу на повећање забиљежено након излагања ћелија комплексу C1.

Комплекси цинка(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине индукују заустављање ћелијског циклуса у G2 фази и на тај начин додатно остварују свој антитуморски ефекат.



Графикон 20. Комплекси цинка са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине индукују заустављање ћелијског циклуса у G2 фази. Заступљеност B16F1 ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса анализирана је проточном цитометријом након што су B16F1 ћелије третирание комплексом цинка(II) са пропенил- SADTA ([Zn(S-propenyl-

thiosal)₂] (C1)), комплексом цинка(II) са изобутенил- SADTA ([Zn(S-isobutenyl-thiosal)₂] (C2)) и цисплатином (CDDP) у концентрацијама које одговарају израчунатим IC₅₀ вредностима. Сви експерименти рађени су у трипликату, а резултати оствареног ефекта приказани су као средња вриједност±стандардна девијација

5. ДИСКУСИЈА

У овој студији испитивана је хемијска карактеризација и цитотоксични потенцијал два нова комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине.

По први пут урађена је микроанализа, IR, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопија и описана бидентатни начин координовања лиганата за јон цинка(II).

У даљем истраживању, цитотоксична активност комплекса поређена је са оксалиплатином и цисплатином и анализирана је на двије различите туморске ћелијске линије: мишји карцином дебелог цријева (CT26) и мишји меланом (B16F1), док су не-туморске мишје мезенхимске матичне ћелије (mmMSCs) коришћене као контрола. Оба комплекса показала су умјерену активност против ћелија мишјег рака дебелог црева и меланома. Смањење вијабилности ћелија меланома је изазвано задржавањем ћелије у G2 фази ћелијског циклуса и апоптозом. Цинк (II) комплекс са S-алкенил тиосалицилном киселином, иако има значајно слабији цитотоксични ефекат на туморске ћелије него оксалиплатина и цисплатина, дјелује селективније на туморске ћелије од познатих љекова.

Малигне неоплазме представљају водећи узрок смрти у развијеним земљама (160). Истраживања су показала да је само у 2018. години дијагностиковано око осамнаест милиона новооболелих од различитих типова малигних неоплазми, а чак девет милиона смртних случајева је забиљежено широм свијета (161). Сматра се да главну улогу у настанку малигнитета има оштећење молекула DNA, односно промјене у секвенцама DNA молекула.

Из тог разлога недвосмислено се сматра да су малигнитети генетске болести, која настају услед синергистичког дејства више фактора као што су активација онкогена, дисфункција тумор супресор гена или утицај спољног фактора (162). Такође, сматра се да кључну улогу у спречавању настанка малигне пролиферације ћелија има одговарајућа, односно правилна сигнализација процеса апоптозе. Малигно измијењене ћелије користе различите „стратегije“ како би избјегле програмирану ћелијску смрт, апоптозу. Услед тога мијења се експресија, локализација и активност регулаторних молекула у малигно трансформисаној ћелији који су одговорни за физиолошко одвијање процеса апоптозе или ћелијског циклуса (163).

У терапији различитих типова малигнитета се, поред хируршке и зрачне терапије користе и љекови цитостатици, а њихова главна улога је да спречавају пролиферацију и умножавање и дисеминацију малигно измијењених ћелија (164). Међутим, након дуготрајне примјене цитостатика, често се јављају нежељена дејства ових љекова која настају као посљедица дејства цитостатика на здраве, малигно неизмијењене ћелије, а могућа је и појава резистанције тумора на примијењену терапију (165). Сматра се да пацијенти који у терапији малигнитета користе комплексе платине, као што су цисплатин, карбоплатин и оксалплатин могу имати велики број нежељених ефеката који укључују нефротоксичност, ототоксичност, кардиотоксичност, мијелосупресију, повраћање, анорексију, алопецију и друге (166).

Из тих разлога, главни циљ актуелних истраживања у терапији малигнитета представља проналажење нових антитуморских агенаса који могу селективније и ефикасније дјеловати на туморске ћелије, уз мање нежељених ефеката (167).

5.1. Хемијска карактеризација

Спроведене анализе су нам дале увид у начин координовања слободних SADTA за централни јон метала у испитиваним комплексима цинка (II). Анализе су показале асиметричну валенциону вибрацију испитиваних комплекса, која потиче од карбоксилних група SADTA координованих за централни јон цинка. IR анализе су показале додатне траке у области $\approx 3400 \text{ cm}^{-1}$, за оба комплекса, што указује на присуство координованих молекула воде. ^1H и ^{13}C NMR спектри су са још већом сигурношћу потврдили структуру комплекса и позиције слободних тиосалицилних пролиганада. Подаци из инфрацрвених спектра нису омогућили целокупну анализу структуре комплекса цинка (II) са SADTA. За детаљнију анализу структуре била су неопходна додатна испитивања.

5.2. Интеракција комплекса цинк (II) са SADTA и DNA

Једна од најчешће коришћених метода за карактеризацију везивања комплекса метала са DNA је UV-Vis спектроскопија. Генерално, комплекси прелазних метала могу везати DNA преко ковалентне и/или нековалентне интеракције. Прогресивно додавање CT-DNA раствору комплекса C1 праћено је значајним хиперхромним ефектом формирањем новог апсорпционог максимума на 262 nm. Резултати комплекса C2 били су прилично слични. Резултати показују интензивну интеракцију нових комплекса и CT-DNA спољашњим контактима. Вероватно су у питању водоничне везе и електростатичке интеракције.

Константе везивања K_b (M^{-1}) за комплексе су израчунати да би се процијенила јачина ових интеракција. Прерачунате вриједности K_b (M^{-1}) за комплексе су $(7.84 \pm 0.07) \times 10^3$ и $(1.1 \pm 0.1) \times 10^4$ за комплекс C1 и C2. Поређења ради, вриједност K_b (M^{-1}) за класични интеркалатор етидијум бромид (EB) је $(1.23 \pm 0.07) \times 10^5 M^{-1}$ (168). Дакле, ови комплекси су слабије повезани него EB са DNA. Ипак, добијене K_b вриједности су сличне онима објављеним недавно за неке сличне комплексе метала са S-алкил дериватима тиосалицилне киселина (171).

5.3. Испитивање *in vitro* антиканцерског ефекта комплекса цинка(II) са SADTA

У проналажењу ефикаснијих и селективнијих цитотоксичних агенаса први корак представља испитивање ефекта на ћелије карцинома, *in vitro*.

Испитивана су два цинк(II) комплекса са SADTA као и њихових комплементарних лиганата на вијабилност туморских ћелија мишјег карцинома колона CT26 и мишјег меланома B16F1. Такође, испитиван је цитотоксични ефекат ових комплекса и лиганата на мишје мезенхималне матичне ћелије mMSCs.

Карцином колона представља трећи најчешће дијагностиковани карцином и један је од водећих узрока смрти у свету (169), па смо из тог разлога прво испитивали цитотоксични ефекат комплекса цинка(II) и одговарајућих лиганата на ћелије мишјег карцинома колона CT26. Такође, због своје клиничке примјене у терапији карцинома колона испитиван је цитотоксични ефекат цисплатине и оксалаплатине на CT26 ћелије. У нашем истраживању резултати су показали да примјена новосинтетисаних цинк(II) комплекса C1 и C2 као и примјена цисплатине и оксалаплатине статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома колона CT26 у односу на вијабилност нетретираних ћелија након 24, 48 и 72 часа култивације. Такође резултати су недвосмислено показали да одговарајући лиганд L1 и лиганд L2 показују незнатни цитотоксични ефекат у сва три временска интервала (24, 48 и 72 часа).

Концентрација комплекса C1 потребна да смањи вијабилност CT26 ћелија за 50% (IC_{50}) је након 24 часа износила $127,3 \pm 7,2 \mu M$, након 48 часова $101,9 \pm 8,9 \mu M$ и након 72 часа $92,9 \pm 7,9 \mu M$. IC_{50} вриједности израчунате за комплекс C2 после 24, 48 и 72 часа су $119,2 \pm 9,6 \mu M$, $85,8 \pm 11,3 \mu M$ и $81,9 \pm 8,6 \mu M$, а IC_{50} цисплатине за исту ћелијску линију су $61,2 \pm 7,8 \mu M$, $24,5 \pm 4,3 \mu M$ и $11,8 \pm 3,1 \mu M$. IC_{50} вриједности оксалаплатине израчунате за CT26 ћелије је након 24 часа $59,1 \pm 4,8 \mu M$, након 48 часова $19,8 \pm 4,7 \mu M$ и након 72 часа $15 \pm 2,9 \mu M$. IC_{50} вриједности лиганата L1 и L2 за CT26 ћелије након 24, 48 и 72 часа биле су $>200 \mu M$.

На основу приказаних IC_{50} вриједности и добијених резултата можемо закључити да је за новосинтетисани комплекс C1 присутна позитивна корелација инкубационог периода и

цитотоксичког ефекта на СТ26 ћелије; комплекс С1 је испољио умјерени цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије. Потребна је 8x већа концентрација комплекса С1 у односу на цисплатину и око 6x већа концентрација комплекса С1 у односу на оксалиплатину да би се смањила вијабилност СТ26 ћелија за 50% након 72 часа инкубације.

Резултати показују да дужа инкубација комплекса С2 резултује већом цитотоксичношћу на СТ26 ћелије. Такође, показано је да комплекс С2 испољава умјерени цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије. IC_{50} вриједност након 72 сата забележена за комплекс С2 је 7x мања ако се пореди са цисплатином и 5x мања ако се пореди са оксалиплатином.

Приказани резултати показују да су добијене сличне IC_{50} вриједности за комплексе С1 и С2.

Хемиотерапеутици у клиничкој примјени цисплатина и оксалиплатина са повећањем периода инкубације имају већи цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије, односно цисплатина и оксалиплатина су статистички значајно смањили вијабилност туморских ћелија у сва три временска интервала.

На основу приказаних IC_{50} вриједности и добијених резултата можемо закључити да су цисплатина и оксалиплатина показали снажнији цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије у односу на новосинтетисане комплексе цинка са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине С1 и С2.

Цитотоксични ефекат новосинтетисаних цинк (II) комплекса у нашем истраживању је испитиван и на ћелијама мишјег малигног меланома В16F1. Показано је да примјена новосинтетисаних комплекса С1 и С2 статистички значајно смањује вијабилност В16F1 ћелија након 24, 48 и 72 часа култивације. Истраживање је показало да IC_{50} вриједности за комплексе С1 и С2 након 24 часа култивације износе $>200\mu\text{M}$ и $161,9 \pm 9,6\mu\text{M}$. Такође, након 48 часова инкубације IC_{50} вриједности за комплексе С1 и С2 износе $147,2 \pm 11,9\mu\text{M}$ и $108,6 \pm 11,3\mu\text{M}$, а након 72 часа култивације В16F1 ћелија, IC_{50} вриједности за комплексе С1 и С2 износе $99,6 \pm 8,9\mu\text{M}$ и $98,6 \pm 8,4\mu\text{M}$. Концентрација цисплатине која је потребна да смањи вијабилност В16F1 ћелија за 50% је после 24, 48 и 72 часа износила $148 \pm 7,2\mu\text{M}$, $45,5 \pm 7\mu\text{M}$ и $15 \pm 4,2\mu\text{M}$. Након 24, 48 и 72 часа култивације, концентрација оксалиплатине која је потребна да смањи вијабилност В16F1 ћелија за 50% износила је $>200\mu\text{M}$, $>200\mu\text{M}$ и $17,4 \pm 3,7\mu\text{M}$. Концентрација лигананда L1 и L2 која је потребна да смањи вијабилност В16F1 ћелија за 50% је у сва три временска интервала (24, 48 и 72 часа култивације) износила $>200\mu\text{M}$.

Након 72 часа инкубације комплекс С1 као и комплекс С2 су испољили умјерени цитотоксични ефекат на В16F1 ћелије. Резултати показују да је потребна око 7 пута већа концентрација комплекса С1 и С2 у односу на цисплатину и оксалиплатину након 72 часа инкубације да би дошло до смањења вијабилности за 50% В16F1 ћелија. Из овога можемо јасно и недвосмислено закључити да су цисплатина и оксалиплатина показали снажан цитотоксични ефекат на В16F1 ћелије као и да након 72 часа инкубације IC_{50} вриједности за цисплатину и оксалиплатину су приближно исте. Као и на ћелијској линији СТ26, испитивани лиганди L1 и L2 су испољили незнатни цитотоксични ефеката на В16F1 ћелије у сва три временска интервала.

Сматра се да једна од најважнијих карактеристика сваког испитиваног потенцијалног хемиотерапеутика селективност, односно испитавана супстанца мора да посједује незнатни или врло слаб цитотоксични ефекат према малигно неизмијењеним ћелијама здравог ткива. Стога је у нашем истраживању испитиван цитотоксични ефекат комплекса С1 и С2 и на малигно неизмијењеним ћелијама, на ћелијској линији мишије мезенхималне стем ћелије mMSCs.

Резултати нашег истраживања показују да након 72 часа инкубације mMSCs ћелија, IC₅₀ вриједност за комплекс C1 износи >200µM, док за комплекс C2 након 72 часа инкубације IC₅₀ вриједност износи 22,9 ± 1,7µM. Концентрације цисплатине и оксалплатине које су смањивале вијабилност mMSCs за 50% су износиле 1.8 ± 0.9µM и 2.1 ± 1µM. Израчунате IC₅₀ вриједности за лиганде L1 и L2 након 72 часа инкубације износе >200µM.

На основу приказаних IC₅₀ вриједности можемо закључити да је комплекс цинка C1 испољио врло слаб цитотоксични ефекат у односу на остале испитиване супстанце. Резултати јасно показују да је потребна око 100x већа концентрација комплекса C1 у односу на цисплатину и оксалплатину и око 10x већа концентрација комплекса C1 у односу на комплекс C2 да би се вијабилност mMSCs ћелија смањила за 50% након 72 часа култивације. Такође, из наведеног можемо закључити да су комплекс C2, цисплатина и оксалплатина испољили веома снажан цитотоксични ефекат на mMSCs ћелије. Као и комплекс C1, такође и испитивани лиганди L1 и L2 испољили су веома слаб, прецизније незнатни цитотоксични ефекат на mMSCs ћелије након 72 часа култивације.

Чињеница да су лиганди испољили слаб цитотоксични ефекат на испитиване туморске ћелије нам показује да су атоми цинка, који су саставни дио комплекса, заправо главни носиоци биолошке активности наших комплекса. С друге стране, пошто постоји разлика у цитотоксичности једног и другог комплекса на истом типу туморских ћелија, та разлика је највјероватније последица различитих физичко-хемијских карактеристика лиганада. Прецизније, разлика у хемијској структури лиганада утиче на растворљивост, а тиме и транспорт комплекса кроз мембране туморских ћелија и интеракције са кључним молекулима у ћелији који су одговорни за њено функционисање.

Уопштено говорећи, комплекси метала су веома актуелни у данашњим истраживањима антитуморских агенаса, па стога и не чуди што је велики број других аутора такође испитивао антитуморско дејство комплекса цинка, додуше другачије хемијске структуре у односу на наше комплексе. Иако је и код ових аутора, као у нашем истраживању, цинк носилац биолошке активности комплекса, извјесне разлике у биолошкој активности ипак постоје.

Sergio и коаутори су 2018. године испитали цитотоксичност два комплекса цинка(II) (у раду обиљежени као комплекс 4 и комплекс 5) на СТ26 ћелије. Након 24 часа IC₅₀ вриједности за комплекс 4 и комплекс 5 износиле су 0,5 ± 0,1 µM односно 2.3 ± 0.6 µM. Такође, показано је да након третмана ови комплекси индукују повећану продукцију реактивних кисеоничних врста код СТ26 ћелија. У поређењу са нашим резултатима, комплекси 4 и 5 су показали знатно снажнији цитотоксични ефекат у односу на комплексе цинка C1 и C2, али ефекат комплекса 4 и 5 није испитиван на малигно неизмијењеним ћелијама (170).

Још једно истраживање, истраживање Silconi и сарадника је показало да су цинк(II) комплекси (сличне структуре као комплекси C1 и C2) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине обиљежени C6-C10 испољили снажан цитотоксични ефекат на мишије леукемијске ћелије BCL1, хумане леукемијске ћелије JVM-13, мишије ћелије карцинома дојке 4T1 и хумане ћелије карцинома дојке MDA-MB-468. Ефекат на ћелијске линије СТ26 и В16F1 није испитиван, као ни ефекат на малигно неизмијењеним ћелијама (171).

У оба претходно наведена истраживања комплекси цинка, на први поглед, дјелују ефикасније на туморске ћелије у односу на наше комплексе. Интересантно је да ни у једном ни у другом истраживању није испитан ефекат комплекса на некој популацији малигно нетрансформисаних ћелија, што је разлика у односу на наше истраживање.

С друге стране у свом истраживању, Lopes и сарадници су показали да новосинтетисани цинк(II) комплекси, комплекси 1 и 2 показују велику селективност када је у питању цитотоксични ефекат ових комплекса. Наиме, комплекс 1 и 2 су показали незнатни цитотоксични ефекат на хумане фибробласте, док су снажан цитотоксични ефекат испољили на серији туморских ћелија (HerG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145) (172). Резултати истраживања Lopes-a и сарадника су у потпуности у складу са резултатима нашег истраживања, гдје смо такође показали да комплекси цинка дјелују селективно цитотоксично на туморске ћелије.

Даља анализа комплекса цинка са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине подразумијева поређење са ефектима комплекса сличне хемијске структуре, али који у својој структури садрже неки други метал. Томовић и коаутори су 2016. године испитали цитотоксичност два бакар(II) комплекса са SADTA, односно то су комплекси сличне структуре као C1 и C2. Испитивање вијабилности је показало да лиганди и бакар(II)-комплекси имају цитотоксички ефекат према ћелијама малигног тумора дебелог цријева човјека. Комплекси бакра(II) су показали мању цитотоксичност у односу на цисплатину. Међутим, веће концентрације имале су сличан ефекат као цисплатина. Цитотоксични ефекат комплекса бакра(II) није испитиван на малигно неизмијењеним ћелијама (173).

Из наведених радова као и нашег истраживања можемо закључити да комплекси цинка са различитим лигандима показују велику селективност, односно испољавају снажнији цитотоксични ефекат на различитим малигно измијењеним ћелијама (хуманог и мишијег поријекла), док знатно слабији ефекат показују на здравим ћелијама (матичне ћелије и фибробласти). Управо је та селективност и највећа предност наших комплекса у односу на цитотоксичност неких других комплекса. Јер чак иако дјелују мање токсично на туморске ћелије у односу на комплексе неких других аутора, наши комплекси дефинитивно више „штеде“, односно слабије дјелују на здраве ћелије. То касније може да представља њихову кључну предност у односу на друге хемиотерапеутике, јер се очекује, на основу резултата које смо добили, да наши комплекси имају мање нежељених дејстава у односу на цисплатину и оксалиплатину. Ипак, ове претпоставке тек треба да се докажу у неким будућим *in vivo* и клиничким студијама.

In vitro студије цитотоксичности указују на потенцијал антиканцерских љекова комплекса цинка(II), уз даље истраживање механизма антитуморске активности ових комплекса.

5.4. Анализа апоптозе туморских ћелија након третмана комплекса цинка(II) са SADTA

Раст и диференцијација туморских ћелија није под „контролом“ механизма који постоје у малигно неизмијењеним ћелијама. Неке малигно измијењене ћелије карактерише брзо размножавање, а неке споро размножавање и избјегавање процеса програмиране ћелијске смрти. Из наведеног можемо закључити да се поједине туморске ћелије не дијеле брже од малигно неизмијењених ћелија, већ је значајније да њихов раст и пролиферацију не контролишу регулаторни процеси (174). Апоптоза је програмирана ћелијска смрт, али је са друге стране потребно нагласити да је и за сам процес канцерогенезе врло битна инактивација анти-апоптотског система. Стога је, настанак „резистенције“ туморских ћелија на процес програмиране ћелијске смрти, апоптозе, један од кључних фактора за настанак малигнитета (174, 175).

Управо из тог разлога смо жељели да утврдимо да ли смањење В16F1 ћелија након третирања са IC₅₀ вриједностима комплекса цинка C1, C2 и цисплатине у периоду од 24

часа настаје индукцијом процеса апоптозе. Наша истраживања су недвосмислено показала да је третман комплексом C1 (IC_{50} вриједност), након 24 часа, доминантно смањило вијабилност V16F1 туморских ћелија индукцијом ране апоптозе. Такође, комплекс C2 као и цисплатина су доминантно смањивали вијабилност V16F1 туморских ћелија индукцијом ране апоптозе.

Слични резултати су приказани у истраживању, где су Gao и сарадници такође показали да комплекс цинк(II) означен као комплекс C3 индукује процес апоптозе у ћелијама хуманог карцинома дојке MCF7 (176). Zhang и сарадници су 2018. године у свом истраживању испитивали којим механизмом два новосинтетисана цинк(II)комплекса доводе до статистички значајног смањења вијабилности ћелија хуманог поријекла хепатоцелуларног карцинома BEL-7404. Резултати су недвосмислено показали да је доминантан тип ћелијске смрти индукција процеса апоптозе (177). Liu и коаутори су потврдили да новосинтетисани цинк(II) комплекс индукује процес апоптозе у ћелијама хуманог карцинома дојке MCF7 (178).

Резултати у нашем истраживању као и резултати у наведеним литературима показали су да комплекси цинка индукују процес апоптозе третираних туморских ћелија са малим процентом некротичних ћелија и да из тог разлога долази до смањења вијабилности третираних ћелија, односно да цитотоксичност комплекса цинка настаје као последица индукције апоптозе третираних туморских ћелија.

5.5. Анализа ћелијског циклуса туморских ћелија након третмана комплекса цинка(II) са SADTA

Основни и главни циљ у терапији свих видова малигнитета је изазивање смрти туморске ћелије са минималним оштећењем малигно неизмијењених здравих ћелија. Истраживања су показала да се процес канцерогенезе може зауставити на два начина, индукцијом процеса апоптозе или заустављањем ћелијског циклуса (174). У наставку нашег истраживања смо одређивали проценат туморских ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса, након третмана новосинтетисаним комплексима цинка C1, C2 и цисплатине.

Новосинтетисани комплекс цинка C1 у концентрацији од 200 μ M је зауставио ћелијски циклус V16F1 ћелија у G_2/M фази. Такође, сличан ефекат имамо након третмана комплекса цинка C2 у концентрацији од 161 μ M, односно застој у G_2/M фази у односу на нетретиране туморске ћелије. Истраживање које су спровели Zhang и сарадници показало је да након третмана цинк комплекса, комплекс 1 прави застој у G_1 и G_2/M фази ћелијског циклуса туморских ћелија хуманог поријекла MCF-7 (297). Qin и коаутори су показали да цинк(II) комплекс, комплекс 1 индукује застој у G_1 фази ћелијског циклуса ћелија карцинома мокраћне бешике хуманог порекла T24 (179).

На основу резултата добијених у нашем истраживању и наведених резултата из истраживања других аутора можемо закључити да комплекси цинка могу дјеловати цитотоксично индукујући процес апоптозе или заустављајући ћелијски циклус у одређеној фази. Познато је да некроза може изазвати инфламацију и локално оштећење здравог ткива, а да је насупрот томе, апоптоза контролисан и јасно регулисан процес ограничен на појединачне ћелије који не изазива оштећење околних ћелија. Стога је индукција процеса апоптозе најпожељнији и најприкладнији начин којим се може изазвати смрт туморских ћелија (180). Испитивани комплекси цинка доминантно индукују смрт туморских ћелија индукцијом апоптозе. Ипак, апоптоза и ћелијски циклус су директно повезани. „Машинерија“ ћелијског циклуса садржи сет молекула који су укључени у процес

регулације апоптозе. Уколико дође до оштећења ћелије, ови молекули заустављају ћелијски циклус и тиме омогућавају ћелији да поправи настала оштећења (181). Уколико ћелија није у могућности да та оштећења поправи, започиње процес апоптозе. Управо из тих разлога, застој у G_2/M фази ћелијског циклуса који настаје третирањем ових ћелија комплексима цинка $C1$ и $C2$, може да буде један од разлога настанка процеса апоптозе третираних туморских ћелија.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати приказани у овом раду по први пут показују да оба испитивана цинк (II) комплекса са S-алкенил тиосалицилном киселином показују умјерену цитотоксичну активност против ћелија карцинома дебелог цријева и меланома. Смањење вијабилности туморских ћелија последица је индукције апоптозе и заустављања ћелијског циклуса у G2 фази. Иако комплекси цинка имају слабији антитуморски ефекат од оксалиплатине и цисплатине, дјелују селективније на туморске ћелије од познатих љекова.

Закључак је изведен на основу сљедећих доказа:

1. Структура синтетисаних бидентатних лиганата претпостављена је на основу резултата инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије (^1H и ^{13}C NMR), док је структура одговарајућих комплекса претпостављена на основу резултата инфрацрвене (IR) спектроскопије, магнетних мјерења и моларне проводљивости. Резултати су потврдили координовање цинк(II)-јона за донорске атоме у молекулу тиосалицилне киселине;
2. Оба испитивана комплекса цинка(II) се везују за CT-DNA, а C2 показује веће вриједности K_b што указује на високоафинитетно везивање комплекса са CT-DNA;
3. Квантитативне студије измјене са EB су показале да се оба комплекса цинка могу везати за одређена мјеста у оквиру DNA молекула;
4. Ова новосинтетисана комплекса цинка(II) су показала умјерену цитотоксичну активност према мишићим ћелијама карцинома дебелог црева и меланома.
5. Комплекс C1 има значајно слабији цитотоксични ефекат према туморским ћелијама у поређењу са цисплатином и оксалиплатином, али дјелује много селективније на туморске ћелије од поменутих цитостатика. Оксалиплатина и цисплатина снажно дјелују на мезенхималне матичне ћелије, док комплекси C1 и C2 не испољавају снажан цитотоксични ефекат према њима;
6. Смањена вијабилност ћелија меланома након третмана комплексима цинка узрокована је индукцијом апоптозе и заустављањем ћелијског циклуса у G2 фази.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

APC	комплекс анафазног промовисања (енгл. <i>anaphase-promoting complex</i>)
ATM	атаксија-телангиектазија-мутирани протеин (енгл. <i>ataxia-telangiectasia-mutated</i>)
ATR	протеин повезан са атаксијом и rad3 (енгл. <i>ataxia and rad3 related</i>)
CAK	CDK активирајућа киназа (енгл. <i>CDK activating kinase</i>)
CDK	Циклин-зависне киназе (енгл. <i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CKI	инхибитори CDK (енгл. <i>CDK inhibitors</i>)
DISC	сигнални комплекс који индукује смрт (енгл. <i>death-inducing signaling complex</i>)
DMEM	(<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	(енгл. <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	(енгл. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	DNA протеин киназа (енгл. <i>DNA protein kinase</i>)
FADD	(енгл. <i>Fas- Associated- Death- Domain- Protein</i>)
FBS	(енгл. <i>Fetal bovine serum</i>)
Gadd45	(енгл. <i>growth arrest and DNA damage inducible gene</i>)
HDAC	протеин хистон деацетилаза (енгл. <i>histone deacetylase protein</i>)
HIV	(енгл. <i>human immunodeficiency virus</i>)
IAP	протеини инхибитори апоптозе (енгл. <i>inhibitors of apoptosis proteins</i>)
ICAD	инхибитор каспазом активираних DNA-зе (енгл. <i>Inhibitor of Caspase Activated DNase</i>)
MT	металотионеин (енгл. <i>Metallothionein</i>)
NPAT	нуклеарни протеин мапиран на ATM локусу
PBS	фосфатни пуфер (енг. <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCNA	нуклеарни антиген ћелијске пролиферације (енгл. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
pRb	ретинобластом супресорски ген (енгл. <i>retinoblastoma tumour suppressor gene</i>)
SADTA	(<i>S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid</i>)
SOD	супероксид дисмутаза (енгл. <i>superoxide dismutase</i>)

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Strohfeltd KA. Essentials of inorganic chemistry: for students of pharmacy, pharmaceutical sciences and medicinal chemistry. 2015; Wiley, University of Reading
2. Wegmüller R, Tay F, Zeder C, Brnic M, Hurrell RF. Zinc absorption by young adults from supplemental zinc citrate is comparable with that from zinc gluconate and higher than from zinc oxide. *J Nutr.* 2014 Feb;144(2):132-6.
3. King JC, Cousins RJ. Zinc. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease.* 10th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. pp. 271–85
4. Prasad AS, Miale A, Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med.* 1963;61:537–49
5. Sandstead HH, Prasad AS, Schulert AR, Farid Z, Miale A, Jr, Bassilly S, et al. Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment. *Am J Clin Nutr.* 1967;20:422–42.
6. Cousins RJ. Zinc. In: Filer LJ, Ziegler EE, editors. *Present Knowledge in Nutrition.* 7th ed. Washington DC: International Life Science Institute Nutrition Foundation; 1996. pp. 293–306.
7. Hambidge M, Krebs NF. Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: Relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:429–52.
8. King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr.* 2000 May;130(5S Suppl):1360S-6S.
9. King JC. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1334S–43S
10. Brown, K.H. & Rivera, Juan & Bhutta, Zulfiqar & Gibson, Rosalind & King, Janet & Lonnerdal, Bo & Ruel, Marie & Sandtröm, B & Wasantwisut, E & Hotz, Christine. (2004). Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull Pp.* 25. S94-S203.
11. Hambidge KM, Walravens PA. Disorders of mineral metabolism. *Clin Gastroenterol.* 1982;11:87–117.
12. Van Wouwe JP. Clinical and laboratory diagnosis of acrodermatitis enteropathica. *Eur J Pediatr.* 1989;149:2–8.
13. Hambidge KM. Human zinc deficiency. *J Nutr.* 2000;130:S1344–9.
14. Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:1062–71.
15. Anderson JJ. Minerals. In: Mahan LK, Escott-stump S, editors. *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy.* USA: WB Saunders Co; 2004. pp. 120–63.
16. Hambidge KM. Zinc and diarrhea. *Acta Paediatr Suppl.* 1992;381:82–6.
17. Ghishan FK. Transport of electrolytes, water, and glucose in zinc deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1984;3:608–12.
18. Brown KH, Peerson JM, Allen LH. Effect of zinc supplementation on children's growth: A meta-analysis of intervention trials. In: Sandström B, Walter P, editors. *Role of Trace Elements for Health Promotion and Disease Prevention.* California: S Karger Pub; 1998. pp. 76–83.

19. Bhutta ZA, Black RE, Brown KH, Gardner JM, Gore S, Hidayat A, et al. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. Zinc Investigators' Collaborative Group. *J Pediatr*. 1999;135:689–97.
20. Shankar AH, Genton B, Baisor M, Paino J, Tamja S, Adiguma T, et al. The influence of zinc supplementation on morbidity due to *Plasmodium falciparum*: A randomized trial in preschool children in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62:663–9
21. Veenemans J, Milligan P, Prentice AM, Schouten LR, Inja N, van der Heijden AC, et al. Effect of supplementation with zinc and other micronutrients on malaria in Tanzanian children: A randomised trial. *PLoS Med*. 2011;8:e1001125.
22. Ataie NJ, Hoang QQ, Zahniser MPD, Tu Y, Milne A, Petsko GA, Ringe D. Zinc Coordination Geometry and Ligand Binding Affinity: The Structural and Kinetic Analysis of the Second-Shell Serine 228 Residue and the Methionine 180 Residue of the Aminopeptidase from *Vibrio proteolyticus*. *Biochemistry* 2008; 47 (29): 7673-7683.
23. McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr*. 2000 May;130(5S Suppl):1437S-46S.
24. Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ*. 2003;326(7386):409–410.
25. Federico A, Iodice P, Federico P, Del Rio A, Mellone MC, Catalano G, Federico P. Effects of selenium and zinc supplementation on nutritional status in patients with cancer of digestive tract. *Eur J Clin Nutr* 2001 55:293–297
26. Prasad AS, Beck FW, Doerr TD, Shamsa FH, Penny HS, Marks SC, Kaplan J, Kucuk O, Mathog RH Nutritional and zinc status of head and neck cancer patients: an interpretive review. *J Am Coll Nutr* 1998.17:409–418
27. Gauna GA, Marino J, Vior MC, Roguin LP, Awruch J. Synthesis and comparative photodynamic properties of two isosteric alkyl substituted zinc(II) phthalocyanines. *Eur J Med Chem* 2011; 46:5532–5539
28. Enyedy ЁА, Nagy NV, Zsigy Ё, Kowol CR, Arion VB, Keppler BK, Kiss T. Comparative solution equilibrium study of the interactions of copper(II), iron(II) and zinc(II) with triapine(3- aminopyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone) and related ligands. *Eur J Inorg Chem* 2010:1717–1728
29. Li MX, Zhang LZ, Yang M, Niu JY, Zhou J. Synthesis, crystal structures, in vitro biological evaluation of zinc(II) and bismuth(III) complexes of 2-acetylpyrazine N(4)-phenylthiosemicarbazone. *Bioorg Med Chem Lett* 2012.22:2418–2423
30. Singh AK, Pandey OP, Sengupta SK. Synthesis, spectral characterization and biological activity of zinc(II) complexes with 3-substituted phenyl-4-amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole Schiff bases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012. 85:1–6
31. Song Y, Leonardo SW, Traber MG, Ho E. Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr* 2009.139(9): 1626-1631.
32. Ho E, Ames BN . Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF kappa B, and API DNABinding and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(26): 16770-16775.
33. Wang X, Fosmire GJ, Gay CV, Leach RM. Short-term zinc deficiency inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate of young chickens. *J Nutr* 2002.132(4): 665-673.
34. Zui Pan, Choi S, Ouadid-Ahidouch H, Yang JM, Beattie JH, et al. Zinc transporters and dysregulated channels in cancers. *Front Biosci* 2017; 22: 623-643.

35. Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Adam V, Hubalek J, et al. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr Med Chem* 2011;18(33): 5041-5051.
36. Ishida T. Cu²⁺ ion solution susceptibility tests against bacteria, and bacteriolysis of peptidoglycan cell wall. *Chemistry and Industry* 2015;66(8): 611-616.
37. Ishida T. Bacteriolyses of Cu²⁺ solution on bacterial cell walls/ cell membrane and DNA base pairing damages. *Japanese Biomedical Research on Trace Elements* 2016; 27(4): 151-161.
38. T. Wehr-Candler, W. Henderson, *Coord. Chem. Rev.* 313 (2016) 111.
39. J.L. Derissen, P.H. Smit, *Acta Crystallogr. A*34 (1978) 842.
40. J. Powell, K. Kalakewich, F. J. Uribe-Romo, J. K. Harper, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 12541.
41. *Supramolecular Chemistry*, J.W. Steed, J.L. Atwood, Wiley, Chichester (2000).
42. K.T. Mahmudov, M.N. Kopylovich, M.F.C. Guedes da Silva, A.J.L. Pombeiro, *Coord. Chem. Rev.* (2016) in press.
43. G. Beobide, O. Castillo, J. Cepeda, A. Luque, S. Pérez-Yáñez, P. Román, J. ThomasGipson, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2716.
44. D. Braga, S. d'Agostino, F. Grepioni, *Organometallics* 31 (2012) 1688.
45. D. Braga, L. Maini, M. Polito, F. Grepioni, *Comprehensive Organometallic Chemistry III* (Eds. D.M.P. Mingos, R.H. Crabtree) 12 (2007) 555.
46. D. Braga, L. Maini, M. Polito, E. Tagliavini, F. Grepioni, *Coord. Chem. Rev.* 246 (2003) 53.
47. D. Braga, S.L. Giaffreda, F. Grepioni, L. Maini, M. Polito, *Coord. Chem. Rev.* 250 (2006) 1267.
48. Abdel-Mawgoud AM, Abdel-Hamid R. Cobalt(II), copper(II), zinc(II)-amino and thiosalicylic acids ternary complexes. *Monatsh Chem* 1987;118:1219–1223
49. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Tomović DLJ, Bukonjić AM, Jevtić VV, Ratković ZR, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis and characterization of zinc(II)-complexes with S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Serb J Exp Clin Res* 2018;19:113–117
50. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, Milovanović J, Arsenijević A, Stojanović B, Trifunović SR, Radić GP. Cytotoxicity of copper(II)- complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct* 2016;1116:264–271
51. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:441-70.
52. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv. Cancer Res.* 1995; 66, 181.
53. Pines J. Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ.* 1991; 2, 305.
54. Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29, 559.
55. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 1995; 376, 313.
56. Howard A, Pelc SR. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* 1951; 167: 599-600.

57. Carnero A, Hannon GJ. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1998; 227, 43.
58. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell CL, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell.* 1995;6, 387.
59. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep 15;371(6494):257-61.
60. Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnica-Worms H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol.* 1997 Feb;17(2):571-83.
61. Vermeulen K, Van Bockstaele DR and Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003; 36; 131–149.
62. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature.* 1998 Feb 5;391(6667):597-601.
63. Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell.* 1992 Sep 18;70(6):993-1006.
64. Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, Fletcher JA, Harlow E. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* 2000 Sep 15;14(18):2283-97.
65. Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR. Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation. *Nature.* 1974 Feb 1;247(5439):257–261.
66. Voitenleitner C, Fanning E, Nasheuer HP. Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene.* 1997 Apr 3;14(13):1611-5.
67. Heald R, McKeon F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell.* 1990 May 18;61(4):579-89.
68. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 1989 Nov 3;246(4930):629-34.
69. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):323-31.
70. Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 1999 Dec 17;274(51):36031-4..
71. Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1998;8(5):359-68.
72. Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* 1997 Dec 15;11(24):3471-81.
73. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13, 225.
74. Painter RB. Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1986 May;49(5):771-81.
75. Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Maser R.S., Lin J., Petrini J.H., Kastan M.B. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature.* 2000;404:613–617.
76. Zeng Y., Forbes, K.C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnica-Worms, H., and Enoch, T. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 1998;395: 507-510.

77. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001 Apr 5;20(15):1803-15.
78. Fang G, Yu H, Kirschner MW. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev*. 1998 Jun 15;12(12):1871-83.
79. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1672-7.
80. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*. 1995;269:1281–1284.
81. Easton J, Wei T, Lahti JM, Kidd VJ. Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Res*. 1998;**58**, 2624–2632.
82. Yamamoto H, Monden T, Miyoshi H, Izawa H, Ikeda K, Tsujie M, Ohnishi T, Sekimoto M, Tomita N, Monden M. Cdk2/cdc2 expression in colon carcinogenesis and effects of cdk2/cdc2 inhibitor in colon cancer cells. *Int. J. Oncol*. 1998;**13**, 233.
83. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*. 1996;68:67-108.
84. Galaktionov K, Chen X, Beach D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. 1996 Aug 8;382(6591):511-7.
85. Kamb A (1998) Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. **227**, 139.
86. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
87. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J. Virol*. 1990; **64**, 723-30.
88. Horsthemke B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992 Oct 1;63(1):1-7.
89. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Dec;8(6):805-14.
90. Miller C, Koeffler HP. P53 mutations in human cancer. *Leukemia* **7** 1993;S18-21.
91. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–57.
92. Kerr, J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 1992; 471–4.
93. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-1706s.
94. Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., and Orlandini, S. Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000;182, 41–9
95. Norbury, C. J., and Hickson, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41,2001; 367–401.
96. Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated

- after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1997; 1573–81.
97. Hacker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301,2000; 5–17.
 98. Savill, J., and Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 2000; 784–8.
 99. Majno, G., and Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 1995; 3–15.
 100. Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1997; 1481–6
 101. Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., and Vandenabeele, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 1999; 7719–30.
 102. Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. (1999) Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease* (R. S. Cortan, V. Kumar and T. Collins, eds.), Sixth edition, pp. 1–29. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA.
 103. Igney, F. H., and Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 2002; 277–88.
 104. Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22,2005; 355–70.
 105. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1998; 1305–8.
 106. Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J., and Tschopp, J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol* 1998;161, 3936–42.
 107. Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., Francke, U., Reed, J. C., Kinoshita, S., and Nolan, G. P. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 1998; 8, 461–71.
 108. Brunner, T., Wasem, C., Torgler, R., Cima, I., Jakob, S., and Corazza, N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 2003; 15, 167–76
 109. Trapani, J. A., and Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2003; 2, 735–47
 110. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23, 2861–74.
 111. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102, 33–42.
 112. Chinnaiyan, A. M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999; 1, 5–15.
 113. Ekert, P. G., and Vaux, D. L. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17, 626– 30.
 114. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412, 95–9

115. Cory, S., and Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 2002; 647–56.
116. Schuler, M., and Green, D. R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29, 2001; 684–8.
117. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80, 285–91.
118. Chau, B. N., Cheng, E. H., Kerr, D. A., and Hardwick, J. M. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* 2000;6, 31–40.
119. Liu, F. T., Newland, A. C., and Jia, L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310, 956–62.
120. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288, 1053–8.
121. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
122. Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276, 7320–6.
123. Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., and Bratton, D. L. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276, 1071–7.
124. Renehan, A. G., Booth, C., and Potten, C. S. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 2001; 322, 1536–8
125. Harman, D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 673, 126–41.
126. Kerr, J. F., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73, 2013–26.
127. Worth, A., Thrasher, A. J., and Gaspar, H. B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol* 2006; 133, 124–40.
128. Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A. B. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995; 268, 429–31.
129. Ethell, D. W., and Buhler, L. A. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J Clin Immunol* 2003; 23, 439–46
130. Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., and Orlandini, S. Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2003; 182, 41–9.
131. Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97, 14376–81.
132. Schwartz, L. M., Smith, S. W., Jones, M. E., and Osborne, B. A. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90, 980–4.
133. Gozuacik, D., and Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; 23, 2891–906.

134. Gozuacik, D., and Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; 23, 2891–906.
135. Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., and Herman, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366, 177–96.
136. Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 303–313.
137. Grossmann J. Molecular mechanisms of ‘detachment-induced apoptosis—Anoikis’. *Apoptosis* 2002; 7: 247–260.
138. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552–565.
139. Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 1997; 388: 432–433.
140. Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J et al. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 2004; 11: 1066–1075.
141. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 2000; 38: 31–40.
142. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, Nunez G. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3030–3039.
143. Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella* infected macrophages. *PLoS Pathog* 2007; 3: e111.
144. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004; 430: 213–218.
145. Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 4312–4317.
146. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1590–1604.
147. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 10–22.
148. Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. *Cell Microbiol* 2007; 9: 2562–2570.
149. Tomovic DLj, Bukonjic AM, Kocovic A, Nikolic MV, Mijajlovic MZ, Jevtic VV, Ratkovic ZR, Arsenijevic AN, Milovanovic JZ, Stojanovic B, Trifunovic SR. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of binuclear copper (II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Serb J Exp Clin Res* 2017; 18:13–18
150. Joshi A, Shrivastava DN, Base CS. Synthesis, Characterization and Pharmacological Evaluation of Thiosalicylamide Derivative as a Class of Calcium Channel Blocker. *Int J Pharm Chem*. 2016; 6(1): 1-22.

151. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
152. Ojeda JJ, Romero-Gonzalez ME, Pouran HM, Banwart SA. In situ monitoring of the biofilm formation of *Pseudomonas putida* on hematite using flow-cell ATR-FTIR spectroscopy to investigate the formation of inner-sphere bonds between the bacteria and the mineral. *Min Mag*. 2008; 72:101–106.
153. Gao X, Metge DW, Ray C, Harvey RW, Chorover J. Surface complexation of carboxylate adheres *Cryptosporidium parvum* oocysts to the hematite-water interface. *Environ Sci Technol*. 2009; 43:7423–7429.
154. Novakova O, Chen H, Vrana O, Rodger A, Sadler PJ, Brabec V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* 2003; 42:11544–11554.
155. Recio Despaigne AA, Da Silva JG, da Costa PR, dos Santos RG, Beraldo H. ROS-mediated cytotoxic effect of copper(II) hydrazone complexes against human glioma cells. *Molecules*. 2014; 19:17202–17220.
156. Silconi ZB, Benazic S, Milovanovic J, Jurisevic M, Djordjevic D, Nikolic M, Mijajlovic M, Ratkovic Z, Radić G, Radisavljevic S, Petrovic B, Radosavljevic G, Milovanovic M, Arsenijevic N. DNA binding and antitumor activities of platinum(IV) and zinc(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem*. 2018; 43: 719-729
157. Dhar S, Nethaji M, Chakravarty AR. Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato] copper(II) complexes. *J Inorg Biochem* 2005; 99:805–812.
158. Dimiza F, Fountoulaki S, Papadopoulos AN, Kontogiorgis CA, Tangoulis V, Raptopoulou CP, Psycharis V, Terzis A, Kessissoglou DP, Psomas G. Non-steroidal anti-inflammatory drug-copper(II) complexes: structure and biological perspectives. *Dalton Trans*. 2011; 40:8555–8568.
159. Dimiza F, Perdih F, Tangoulis V, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G. Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: synthesis, structure, DNA-and albumin-binding. *J Inorg Biochem* 2011;105:476–489.
160. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(1):16-27.
161. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
162. Imran A, Qamar HY, Ali Q, et al. Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iran J Public Health*. 2017;46(11):1475–1485.
163. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(6):2129-44.
164. Kummar S, Gutierrez M, Doroshov JH, Murgo AJ. Drug development in oncology: classical cytotoxics and molecularly targeted agents. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62(1):15–26.

165. Brown R, Boger-Brown U. Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms. *Molecular Pathology*. 2000; 53(1):53.
166. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans*. 2018 May 15;47(19):6645-53.
167. Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2002.
168. Recio Despaigne AA, Da Silva JG, da Costa PR, dos Santos RG, Beraldo H. ROS-mediated cytotoxic effect of copper(II) hydrazone complexes against human glioma cells. *Molecules* 2014; 19:17202–17220
169. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015;34(3):1087-96.
170. Riega SDE, Chiarante N, Valli F, Marino J, Roguin LP, Awruch J, Vior MCG. Novel hydro- and lipo-philic selenium zinc(II) phthalocyanines: Synthesis, photophysical properties and photodynamic effects on CT26 colon carcinoma cells. 2018;156:133-39.
171. Silconi ZB, Benazic S, Milovanovic J, Jurisevic M, Djordjevic D, Nikolic M, Mijajlovic M, Ratkovic Z, Radic G, Radisavljevic S, Petrovic B, Radosavljevic G, Milovanovic M. DNA binding and antitumor activities of platinum(IV) and zinc(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem*. 2018;43(8):719-29.
172. Lopes Ede O, Oliveira CG, Silva PB, Eismann CE, Suárez CA, Menegário AA, Leite CQ, Deflon VM, Pavan FR. Novel Zinc(II) Complexes [Zn(atc-Et)₂] and [Zn(atc-Ph)₂]: In Vitro and in Vivo Antiproliferative Studies. *Int J Mol Sci*. 2016;21;17(5). pii: E781.
173. Tomovic D, Bukonjic A, Kocovic A, Nikolic M, Mijajlovic M, Jevtic V, Ratkovic Z, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Trifunovic S, Radic G. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some s-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res*. 2016;18(1). 10.1515/sjecz-2016-0071.
174. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*. Data status, Beograd. 2005.
175. Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?. *Cell Death Dis*. 2016;7(1):e2058.
176. Gao J, Liu YG, Zhou Y, Boxer LM, Woolley FR, Zingaro RA. Artificial zinc(II) regulate cell cycle and apoptosis-related genes in tumor cell lines. *Chembiochem*. 2007;8(3):332-40.
177. Zhang HR, Liu YC, Chen ZF, Guo J, Peng YH, Liang H. Crystal Structures, Cytotoxicity, Cell Apoptosis Mechanism, and DNA Binding of Two 8-Hydroxyquinoline Zinc(II) Complexes. *Russ J Coord Chem*. 2018;44(5):322-34.
178. Liu S, Cao W, Yu L, Zheng W, Li L, Fan C, Chen T. Zinc(II) complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers that trigger DNA damage-mediated p53 phosphorylation in cancer cells. *Dalton Trans*. 2013;28;42(16):5932-40.
179. Qin QP, Meng T, Wei ZZ, Zhang CH, Liu YC, Liang H, Chen ZF. Synthesis, crystal structure, cytotoxicity and action mechanism of Zn(II), Mn(II) and Fe(III) complexes with 6-hydroxyoxoisoaporphine. *Eur. J. Inorg. Chem*. 2017;12:1824-34.

180. Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, Bazan V. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Annals of Oncology*. 2006;17(suppl_7):vii115-23.
181. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2(4):291-9.

Биографија аутора

Ана Поповић је рођена 02.09.1979. године у Подгорици. Завршила је основну школу и Гимназију са одличним успехом у Подгорици, Црна Гора. Дипломирала је на Медицинском факултету у Приштини дана 22.12.2008. године, чиме је стекла стручно звање доктор медицине. Специјалистички испит из Дерматовенерологије положила је 25.01.2017. на Медицинском факултету у Београду и стекла звање специјалисте дерматовенерологије.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Онкологија, уписала је школске 2010/2011. године.

Прве две године радног искуства провела је радећи у Дому здравља, Подгорица као изабрани доктор. Годину дана и шест месеци је провела у Институту за Јавно здравље у Подгорици, потом је 6 месеци радила као клинички лекар на Инфективном одељењу Опште болнице Никшић, потом је као специјализант годину дана провела на Клиници за Дерматовенерологију у Подгорици КЦЦГ а потом наредне три године на Клиници за Дерматовенерологију у Београду, КЦС. По положеном специјалистичком испиту свакодневно ординира у Дерматовенеролошкој амбуланти у Општој Болници Никшић.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Ана Поповић _____, изјављујем да
докторска

дисертација под насловом:

Карактеризација и испитивање антитуморске активности комплекса цинка (II) са S-
алкенил дериватима тиосалицилне киселине

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Универзитета у Крагујевцу 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,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској
форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију
истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____ Крагујевцу _____, 2020. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Ана Поповић _____,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Карактеризација и испитивање антитуморске активности комплекса цинка (II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу , 2020. 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/>