



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ненад Марковић

**Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса
платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro***

Докторска дисертација

коментор: проф. др Срђан Нинковић, ванредни професор

коментор: доц. др Милан Зарић, доцент

Крагујевац, 2020.

ИДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Ненад Марковић	
Датум и место рођења: 22.07.1984. године у Крагујевцу	
Садашње запослење: Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, истраживач-приправник за ужу научну област Хирургија, Крагујевац, Република Србија. Клинички центар Крагујевац, Клиника за општу и грудну хирургију, Крагујевац, Република Србија.	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке <i>in vitro</i>	
Број страница: 128	
Број слика: 15	
Број библиографских података: 181	
Установа и место где је рад израђен: Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Центар за молекуларну медицину и истраживање матичних ћелија	
Научна област (УДК): Медицина, Клиничка и експериментална хирургија	
Коментори: проф. др Срђан Нинковић; доц. Др Милан Зарић	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 28.09.2018.	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-15/37 од 22.01.2019.	
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 <i>Микробиологија и имунологија</i> , председник;	
2. Проф. др Наташа Петронијевић , редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Медицинска и клиничка биохемија</i> , члан;	
3. Доц. др Марија Живковић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Органска хемија</i> , члан	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
1. Доц. др Марија Живковић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Органска хемија</i> , председник	
2. Проф. др Наташа Петронијевић , редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Медицинска и клиничка биохемија</i> , члан	

3. **Доц. др Марко Спасић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: Карцином дојке је значајан медицинско-социјални проблем и свако ново откриће у циљу унапређења метода лечења, је од велике важности. Антитуморска активност деривата платине доказана ранијим истраживањима увела је цисплатину али и карбоплатину и оксалплатину у свакодневну праксу. Иако чине више од 50% клинички примењених агенаса, токсични ефекти, слаба растворљивост али и резистенција тумора на ове агенсе, ограничавају њихову употребу. Стога су синтетисани динуклеарни комплекси платине(II) са намером проналажења нових једињења која би имала боља фармаколошка својства.

Метод: Синтетисали смо одговарајуће платина(II) комплексе, $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$, где је 1,7-phen мостни лиганд 1,7-фенантролин, односно 4,7-фенантролин. Антитуморски ефекат синтетисаних комплекса *in vitro* смо испитали МТТ тестом, анализом ћелија обојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом, анализом молекула укључених у процес апоптозе (Bax, Bcl-2, каспаза-3) и анализом ћелијског циклуса.

Очекивани резултати: Доказали смо да испитивани комплекси показују израженији антитуморски ефекат *in vitro* на 4T1 и MDA-MB-231 ћелијским културама карцинома дојке у поређењу са цисплатином, као и оксалиплатином као лековима који се користе за лечење карцинома дојке.

Очекивани закључак: Наредна истраживања у области синтезе платине са лигандима од фармаколошког значаја би могла бити поткрепљена динуклеарним комплексима платине(II).

Кључне речи: 4T1, MDA-MB-231, карцином дојке, динуклеарни комплекси платине(II), инфрацрвена и НМР спектроскопија, оксалиплатина, цисплатина

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a significant medical and social problem and any new discovery to improve treatment methods is of great importance. The antitumor activity of platinum derivatives proven by previous studies has introduced cisplatin but also carboplatin and oxalplatin into daily practice. Although they comprise more than 50% of the clinically applied agents, toxic effects, poor solubility, and tumor resistance to these agents limit their use. Therefore, dinuclear platinum (II) complexes were synthesized with the intention of finding new compounds that would have better pharmacological properties.

Methods: We synthesized the corresponding platinum (II) complexes, [$\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,7\text{-phen})\}(\text{ClO}_4)_2$ and [$\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}4,7\text{-phen})\}(\text{ClO}_4)_2$, where the 1,7-phen bridge ligand is 1,7-phenanthroline and 4,7-phenanthroline, respectively. The antitumor effect of the synthesized complexes in vitro was examined by MTT assay, analysis of Annexin V stained cells and propidium iodide, analysis of molecules involved in the apoptosis process (Bax, Bcl-2, caspase-3) and cell cycle analysis.

Expected results: We have demonstrated that the investigated complexes show a more pronounced antitumor effect in vitro on 4T1 and MDA-MB-231 breast cancer cell cultures compared to cisplatin as well as oxaliplatin as drugs used to treat breast cancer.

Expected conclusion: Further research in the field of platinum synthesis with ligands of pharmacological importance could be supported by dinuclear platinum (II) complexes.

Keywords: 4T1, MDA-MB-231, breast cancer, platinum (II) dinuclear complexes, infrared and NMR spectroscopy, oxaliplatin, cisplatin

ЗАХВАЛНИЦА

Садржај

1. Увод.....	1
1.1. Опште карактеристике карцинома дојке.....	1
1.1.1. Ембриологија дојке.....	1
1.1.2. Грађа дојке.....	3
1.1.3. Канцерогенеза.....	4
1.1.4. Карцином дојке - (Carcinoma mamme).....	5
1.2. Ћелијски циклус	17
1.2.1. G1/S фаза ћелијског циклуса	20
1.2.2. G2/M фаза ћелијског циклуса	21
1.3. Типови ћелијске смрти	21
1.3.1. Апоптоза.....	22
1.3.2. Аутофагија.....	32
1.3.3. Некроза	33
1.3.4. Некроптоза.....	33

1.4. Примена комплекса платине у медицини	34
1.4.1. Комплекси платине прве генерације	35
1.4.2. Комплекси платине друге и треће генерације	38
1.4.3. Деривати платине у терапији карцинома дојке	40
2. Постављени циљеви и хипотезе у студији	42
3. Материјали студије и методологија	44
3.1. Врста спроведене студије	44
3.2. Култивисање ћелијских линија	44
3.3. Варијабле у истраживању	44
3.4. Синтеза динуклеарних комплекса	45
3.4.1. Синтеза полазног мононуклеарног [Pt(en)Cl ₂] комплекса	45
3.4.2. Синтезе динуклеарних [{Pt(en)Cl ₂ (μ-1,7-phen)](ClO ₄) ₂ и [{Pt(en)Cl ₂ (μ-4,7-phen)] (ClO ₄) ₂ комплекса	45
3.4.3. Елементална микроанализа	46
3.4.4. Инфрацрвена спектроскопија	47
3.4.5. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија	47
3.4.6. Припрема раствора лека	47

3.5. Тест ћелијске пролиферације (МТТ).....	48
3.6. Квантитативно испитивање апоптотске смрти Annexin V-FITC тестом апоптотичности .	50
3.7. Анализа фаза ћелијског циклуса.....	50
3.8. Анализа протеина апоптозе (Bax, Bcl-2, и активне каспазе-3.....	51
3.8.1. Проточна цитометрија протеина апоптозе.....	52
4. Резултати истраживања.....	53
4.1. Синтеза и карактеризација динуклеарних комплекса платине K1 и K2	53
4.1.1. Синтеза и структурна карактеризација динуклеарних $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ комплекса	53
4.1.2. Елементална микроанализа.....	54
4.1.3. Инфрацрвена спектроскопија	54
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија	56
4.2. Испитивање цитотоксичности комплекса.....	58
4.2.1. Цитотоксичност комплекса платине K1, K2, цисплатине и оксалплатине на ћелијске линије карцинома дојке хуманог порекла (MDA-MB-231)	58
4.2.2. Цитотоксичност комплекса платине K1, K2, цисплатине и оксалплатине на ћелијске линије карцинома дојке мишијег порекла (4T1)	61

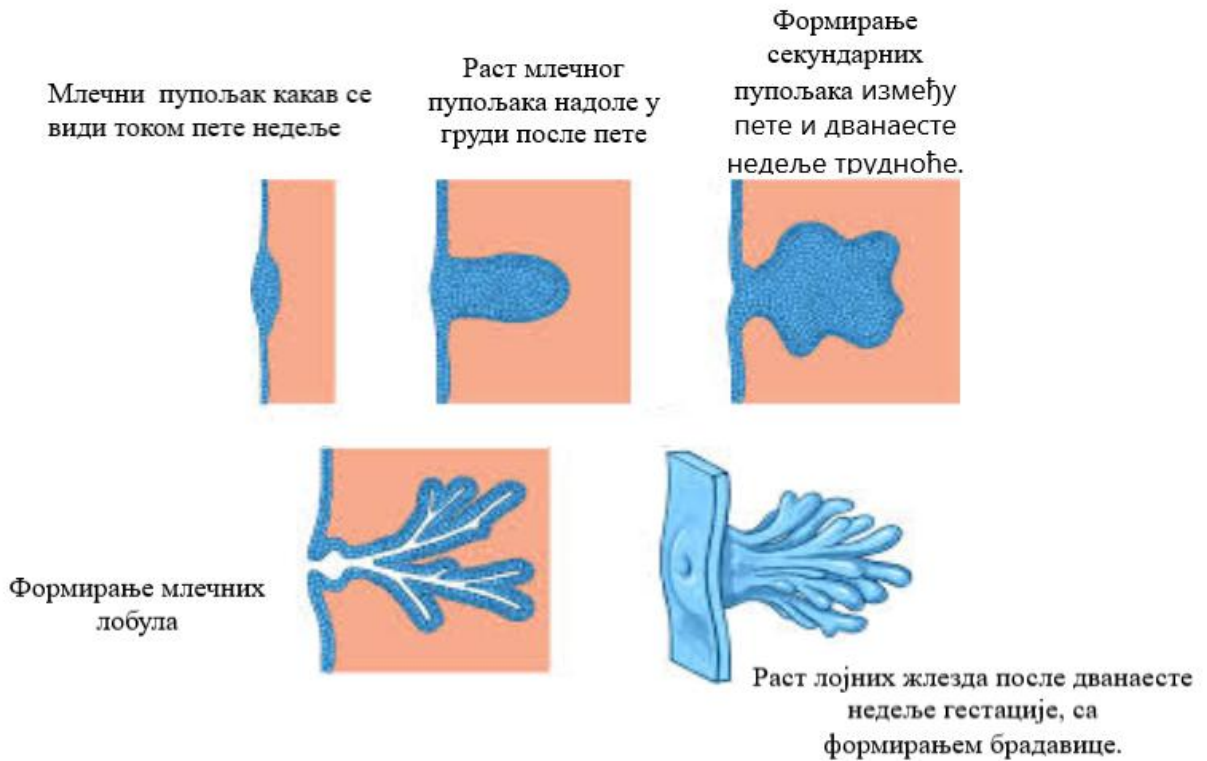
4.2.3. Цитотоксичност комплекса платине K1, K2, цисплатине и оксалплатине на културу здравих фибробласта (MRC-5).....	64
4.3. IC50 вредности испитиваних једињења.....	67
4.4. Индекси селективности испитиваних једињења	76
4.5. Новосинтетисани комплекси платине K1 и K2 делују цитотоксично тако што код малигнох ћелија карцинома дојке хуманог и анималног порекла изаивају апоптозу	81
4.6. Комплекси платине K1 и K2 покрећу митохондријални сигнални пут апоптозе.....	86
4.7. Новосинтетисани комплекси платине K1 и K2 делују на ћелијски циклус	91
5. Дискусија.....	94
6. Закључци.....	102
7. Литература.....	103

1. Уводна разматрања

1.1. Опште карактеристике карцинома дојке

1.1.1. Ембриологија дојке

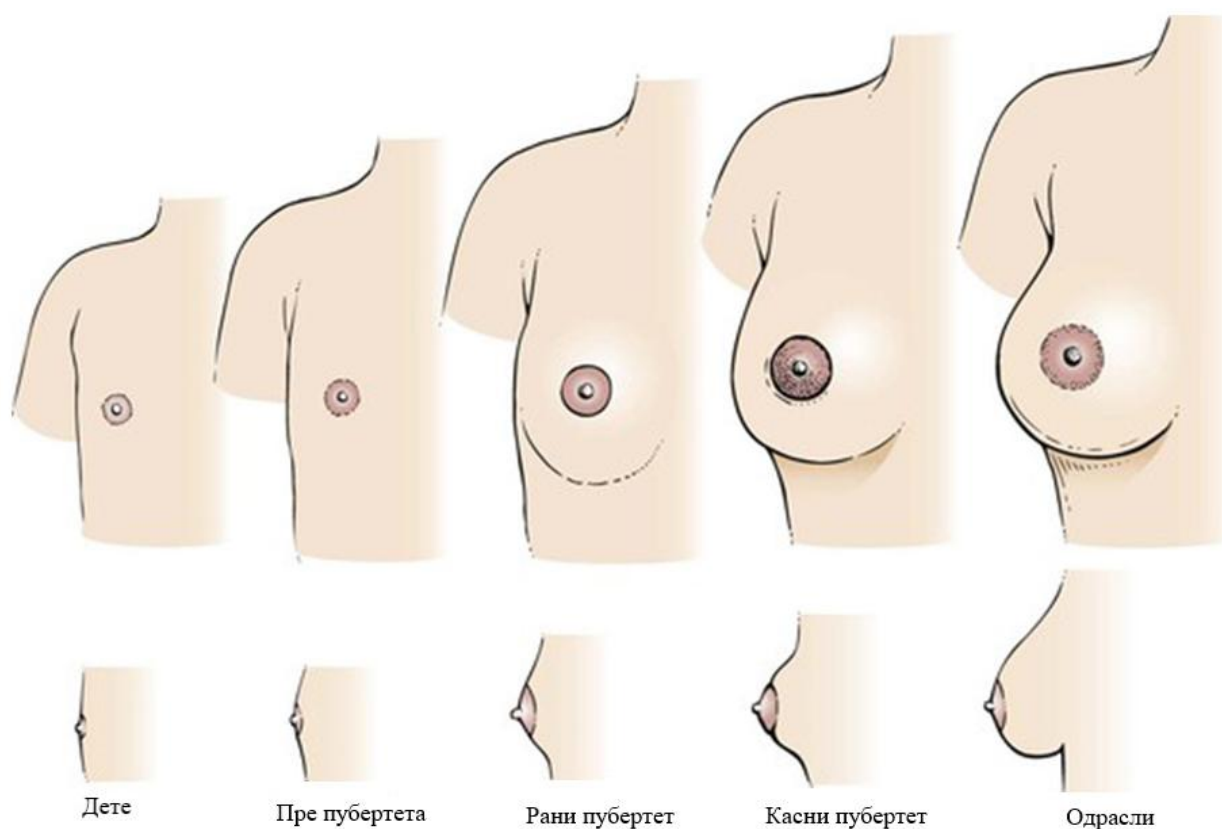
Дојка (lat. mamma, грч. mastos) је млечна жлезда ембиолошки гледано ектодермалног порекла. Заправо по својој грађи представља модификовану знојну жлезду. Зачетак дојке се ембриолошки јавља већ у осмој недељи гестације, у виду задебљања епидермиса или „млечне линије“ (Слика 1).



Слика 1. Ембрионални развој ткива дојке (модификовано из:

<https://slideplayer.com/slide/3878819/>)

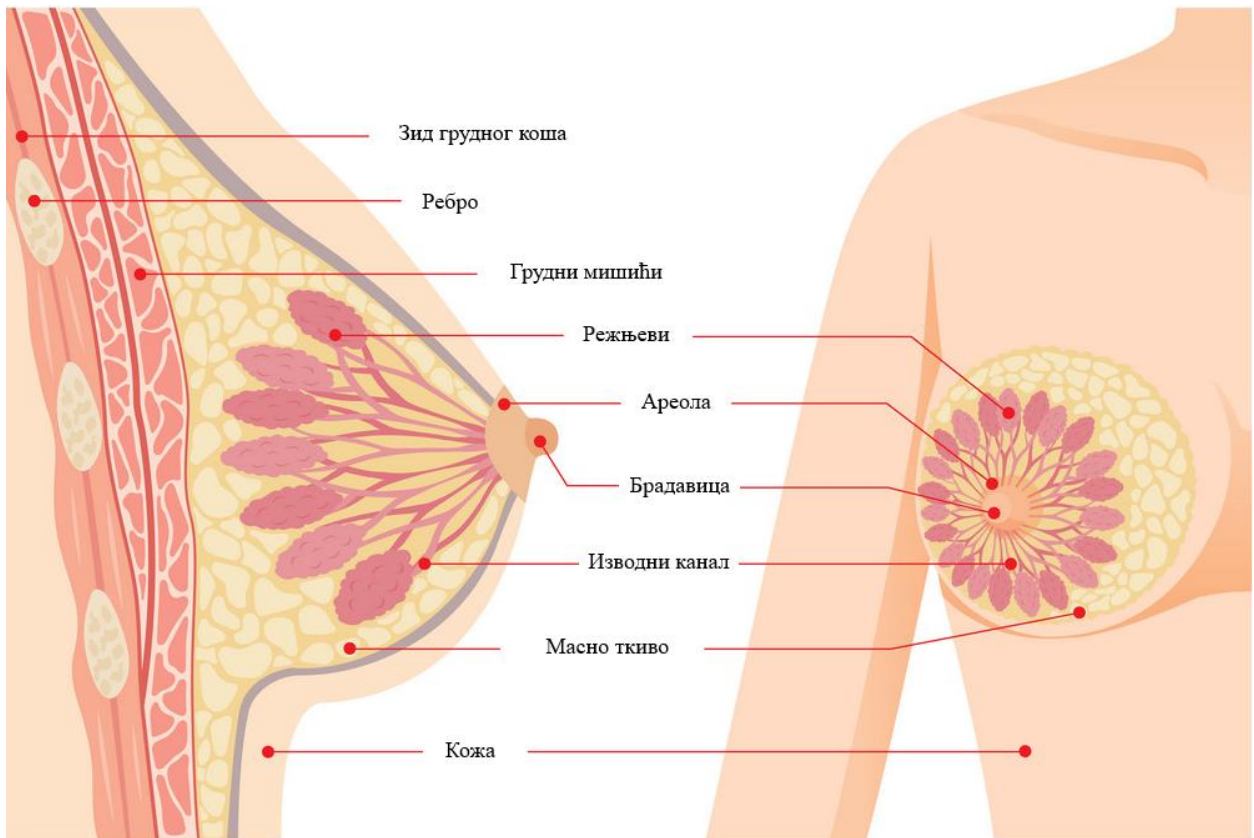
Главни одводни канали режњева млечне жлезде (ducti lactiferi) којих има приближно 25, настају из дисталног епидермиса који урања у мезенхим. У каснијем развоју из епителних трака најпре се разгранавају а потом формирају прави лумен, чији спољашњи отвори по рођењу формирају брадавицу (1). Све до периода пубертета развој дојки је истоветан код оба пола, да би у периоду пубертета био настављен развој епителних трака код девојчица уз нагомилавање масног ткива дојке (слика 2). Дефинитивна диференцијација жлезданог ткива је у периоду трудноће а у старости ткиво дојке улази у тзв. Сенилну инволуцију (2).



Слика 2. Развој дојке од рођења до адолесценције (модификовано из: <http://www.drdeepakulkarni.com/latest-update/development-of-breast/87>)

1.1.2. Грађа дојке

У анатомско хистолошком смислу млечна жлезда је грађена од епителног, везивног и масног ткива. Пропорција ова три саставна елемента варира од узраста, хормонског статуса и генетски је детерминисана. Масно ткиво окружује млечну жлезду. Епително (жлездано) ткиво дојке се састоји од 15 до 20 режњева, који су зракасто распоређени око осовине која пролази кроз брадавицу. Режањ се завршава одводним млечним каналом који се отвара у регији брадавице. Режњеви дојке се састоје из режњића који опет имају своје изводне канале. Основну грађу режњева дојке чине режњићи са изводним каналима. Сам режњић дојке се састоји из тзв. Ацинуса којих има око 100 и представљају секреторни део млечне жлезде (*слика 3*). Унутрашњи зид изводних канала млечних жлезда је грађен од епителног слоја, чија је деоба зависна од естрогена и миоепителних ћелија (3).



Слика 3. Анатомија дојке (модификовано из: <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/cross-section-of-female-breast-anatomy-vector-15819316>)

1.1.3. Канцерогенеза

Трансформација здравих ћелија у канцерогене представља канцерогенезу. Она настаје као резултат поремећеног механизма пролиферације ћелија и поремећене репарације грешака насталих на ДНК акумулацијом генских грешака. Један од највећих оштећења молекула ДНК представљају мутације. Оне настају акцидентално током процеса репликације, али и као резултат експозиције ДНК карциногенима али такође могу настати и у случају када репаративни механизми поправке ДНК постану неефикасни (4). Када дође до малигне трансформације, тада заправо долази до перманентне, патолошке неконтролисане пролиферације ћелија (5). Да би једна ћелија постала малигно трансформисана кључни моменат је поремећај у функцији или грађи гена који регулишу пролиферацију ћелије. Гени, који својим продуктима промовишу физиолошки раст ћелија су протоонкогени. Њиховом мутацијом настају онкогени који синтетишу тзв. онкопротеине. Онкопротеини делују тројако, стимулишу деловање ћелија, инхибирају диференцијацију ћелија и спречавају ћелијску смрт (6). Због свега напред наведеног онкогени све више представљају моћну мету за деловање хемиотерапеутика. На пример поједини лекови делују тако што заустављају процесе транскрипције онкогена као што је трастузумаб коме је механизам деловања повезан са HER-2 онкогеном код карцинома дојке (7). За разлику од онкогена постоји једна група тзв. Тумор-супресор гена који врше поправку оштећења ДНК. Са друге стране тзв. тумор супресорски гени могу да зауставе ћелијски циклус и започину процес програмиране ћелијске смрти и тако исправе грешке у ДНК молекулу. Уколико ови гени изгубе своју функцију последица је неконтролисан ћелијски раст и коначно малигна трансформација ћелија (6). Један од најбитнијих гена из ове групе ген TP53 и његовпротеински продукт p53. Генске мутације TP53 се оучавају код већине малигнух тумора, зато се и овај ген карактерише као „чувар” генома. Протеин p53 се везује за молекул ДНК, активира контролне тачке ћелијског циклуса (енг. checkpoint activation). Исход ове активације је или поправка грешке уколико је оштећење мање или индукција апоптозе уколико је оштећење веће (8).

Са друге стране дејством неких вируса могу такође настати оштећења ДНК и следственој малигној трансформацији ћелије. Поједини РНК вируси (ретровируси) могу да

изазову туморе код животиња а поједини и код људи какав је (HTLV) хумани-Т ћелијски вирус, који припада групи ретровируса и сматра се најважнијим у етиопатогенези хуманог Т-ћелијског лимфома (9).

Хумани папилома вируси (HPV) важе за кључне иницијаторе карцинома на грлићу материце и типичан су пример ДНК вируса који индукују канцерогенезу. Такође вируси хепатитиса В и С се доводе у тесну везу са етиологојом а и патогенезом карцинома јетриних ћелија (10). Да би дошло до увећања туморске масе осим горе наведених генских мутација које за последицу имају и поремећај пролиферације ћелија мора бити укључен и процес ангиогенезе у циљу снабдевања канцерских ћелија кисеоником и потребним нутритивентима. Овај процес је условљен повећаним потребама сада већ измењене ћелије. Такође овај процес је од велике важности и за ширење тумора тј. метастазирање (11). Још једна од карактеристика малигнућ ћелија коју на овом месту треба поменути је појачан метаболизам у енергетском смислу у односу на здраве ћелије. Ове ћелије испољавају тзв. "Варбургов ефекат" што представља способност малигне ћелије да аеробну гликолизу која је заступљена у нормалним ћелијама преведе у анаеробну. Том приликом се ослобађа и до 15 пута мање енергије. Овај процес је праћен великим енергетским губитцима и следственим „гладовањем“ здравих ћелија (12). Секундарни тумор који је настао од примарног на удаљеном месту представља метастазу. Овај процес се може десити путем крви, лимфе, одвајањем у телесне шупљине. У суштини ова особина тумора је кључни проблем у терапији малигнитета али и узрок морталитета и морбидитета (12).

1.1.4. Карцином дојке - (Carcinoma mammae)

Применом напред наведених чињеница о канцерогенези на ткиво дојке долазимо до потенцијалних тачака иницијације тумора дојке. Грешке у геному, од тачкастих мутација, транслокација, делеција, хипердиплоидија до хромозомских реаранжмана имају за последицу активацију онкогена, инактивацију тумор супресор гена или доводе до измене гена који контролишу геном. Тако долази до формирања клонова туморских ћелија са

високим пролиферативним индексом. Клон ћелија се независно размножава и ствара масу туморског ткива и управо оваква ћелија формира тумор. Ако ове ћелије тумора имају способност инвазије, тј. продирања у околна ткива и способност метастазирања, онда је реч о малигном тумору - карциному (13).

1.1.4.1. Епидемиологија карцинома дојке

Карцином дојке је најчешћи малигни тумор код жена у свету и чини више од 20% свих малигних болести у женској популацији. Годишње у свету се открије преко 1,5 милиона нових случајева болести (у Европи преко 360.000) и преко 500.000 смртних исхода са овом дијагнозом (у Европи око 92.000) (14). Једна од осам жена може очекивати да ће током свога живота оболети од ове болести (15). Региони са највишом учесталости болести су западна Европа, северна Америка, Аустралија, Нови Зеланд и неке земље јужне Америке (Аргентина), што се објашњава вишом преваленцијом познатих фактора ризика за ову тумор дојке у овим регионима. Мањи ниво ризика од појаве обољења јавља се у мање развијеним регионима субсахарске Африке, јужне и источне Азије, укључујући и Јапан, где је вероватноћа за појаву карцинома дојке три пута мања него у земљама Европе и Америке. Што се тиче Европе, највише стопе инциденције региструју се у западној и северној, док су стопе у јужној и источној Европи ниже (16).

Према подацима до 2012. Године, од свих новооткривених тумора (морбидитет) код жена у Централној Србији, 26% чине карциноми дојке. (17). Скоро две трећине жена у моменту окривања болести има регионално проширену болест или регионалне метастазе, што има катастрофалне последице. Управо овај податак објашњава висок проценат смртности (морталитет) од ове болести у Србији веома висок (18%) (17). Добро организовани скрининг програми за карциноме дојке до 2 cm у развијеним земљама Европе и САД успешни су у 70-80% случајева, док је у Србији тај проценат знатно мањи (20%).

1.1.4.2. Етиологија карцинома дојке

Данашњи приступ етиолошки карциному дојке је мултифакторијални. Међу бројним факторима предњачи старост, који заједно са генетском предиспозицијом, трајањем и природом репродуктивног периода жене (рана менарха-касна менопауза, нулипаритет, касна прва трудноћа, недојење) и деловањем спољашњих фактора ризика (исхрана, физичка активност, пушење), чини карцином дојке најчешћим малигнитетом код жена. Главни симптом јесте безболна, чврста, неправилно ограничена маса у ткиву дојке. Дијагноза се поставља дефинисаним алгоритмом који се састоји из физичког прегледа, биопсије и неке од *imaging* техника (мамографија, ултразвук, магнетна резонанца). Фактори од прогностичког значаја су величина тумора, нодални статус, хистолошки градус, статус хормонских рецептора. Основа терапијског приступа је операција, са зрачном-, хемио-, хормоно- или циљаном терапијом, или комбинацијом неких од наведених терапијских процедура. Упркос свим напорима и напретку медицине глобално преживљавање од карцинома дојке мање од 55%, што намеће императив што хитнијег увођења индивидуализованог третмана ове болести у клиничку праксу (18). Фактори ризика за карцином дојке су бројни и на жалост делују синергички те није могуће изоловати специфичну улогу сваког од њих.

1.1.4.3. Фактори ризика за настанак карцинома дојке су:

Пол - У 60-100 пута се чешће јавља код жена него код мушкараца (17);

Године старости—Вероватноћа појаве карцинома дојке се повећава са годинама старости. Учесталост појаве карцинома дојке код жена у Србији постепено се повећава са годинама живота до 60. године живота, након чега полако почиње да опада. У Србији највећа узрасно-специфична стопа инциденце карцинома дојке код жена забележена је у старосној групи од 55 до 65 година (17);

Породична историја - (генетички фактори). Генетички фактори дају одговор за појаву карцинома дојке у 5 до 10% случајева и повезани су са мутацијама у генима BRCA1 и BRCA2;

Претходна дијагноза бенигних промена у дојци - атипична дуктална хиперплазија, лобуларна хиперплазија, лобуларни карцином *in situ*, папиломи;

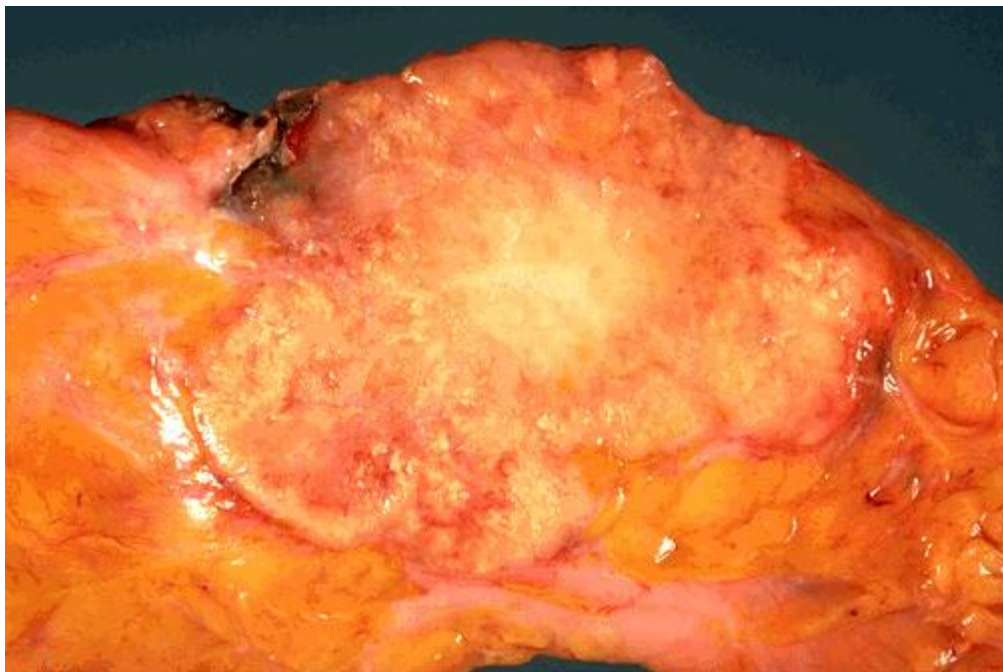
Исхрана—Као и за већину болести малигног карактера бројне студије показују да стил живота и навике у исхрани представљају ризикофактор. Унос великих количина висококалоричне хране, масти и протеина животињског порекла сматра се као битан фактор ризика за настанак ове болести код жена у постменопаузи (19) *Алкохол* - Конзумирање чак и умерених количина алкохола се неким студијама доводи у везу са појавом карцинома дојке. Редовно конзумирање алкохола, као и други фактори средине могу изазвати промене у генској експресији различитих сигналних путева (20). Чак и мале концентрације етанола (0,06%) имају штетан утицај на транскрипцију гена везаних за малигну пролиферацију епителних ћелија млечне жлезде. Етанол повећава активност естрогена, индукујући пролиферацију преко СР450 ароматазе (хумани цитохром СYP19 или Р450 ароматазе) сигналног пута и могао би да има кључну улогу у раном развоју аденокарцинома дојке (21);

Зрачење—Радови из литературе наводе да свака доза зрачења се може довести у везу са карценогенезом, нема мале дозе. (22). Штавише, неки аутори сматрају да радиотерапија као терапијска мера повећава ризик од појаве карцинома друге дојке (23).;

Стрес—Код здравих, нормалних ћелија постоје ензимски системи за превенцију, репарацију и корекцију грешака на ДНК, а које су настале као последица дејства различитих унутрашњих и спољашних стресних реакција. Али код ћелија карцинома, стрес утиче на ослобађање високих концентрација слободних радикала, које превазилазе могућности заштитних репаративних система ћелије повећањем учесталости мутација (24, 25).

1.1.4.4. Макроскопске карактеристике малигнух тумора дојке

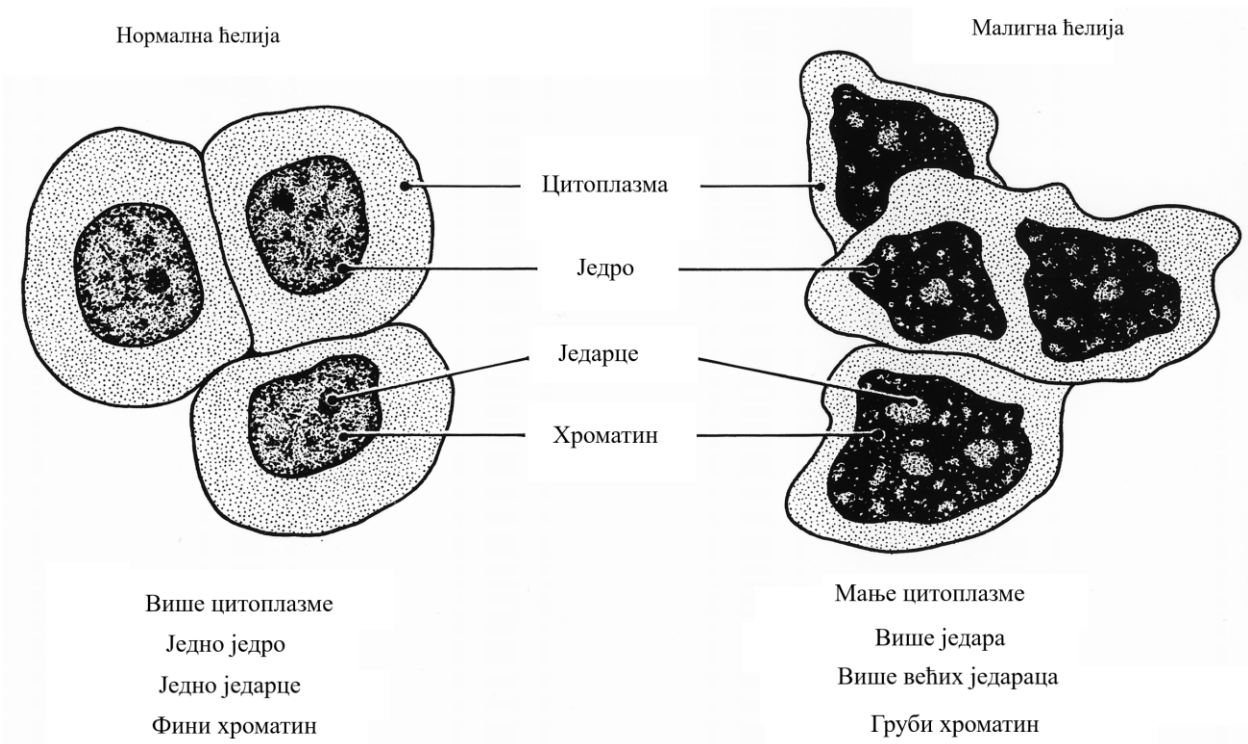
Макроскопске особине карцинома дојке су детерминисане њиховим ткивним пореклом, хистолошким типом односно подтипом. На попречном пресеку су нејасно ограничени од околине, неправилног облика а на додир имају чврсту и неретко зрнасту грађу. Обзиром да имају доста фиброластичног ткива на пресеку су беличасте боје са тракастим формацијама (*слика4*). Изузетака разуме се има, ретко карцином дојке макроскопски може бити јасно ограничен од околног ткива, мекане конзистенције. Голим оком се понекад у оквиру самог карцинома могу уочити зоне некрозе и крварења (папиларни и медуларни карциноми). Додуше ретка форма али описана су малигни филодни карциноми, и они су великих димензија (медијана 60 милиметара), чврсте конзистенције, јасно ограничени од околине са цистичним просторима. У њима се такође могу запазити некротична поља (2).



Слика 4. Макроскопске карактеристике малигног тумора дојке на попречном пресеку (модификовано са сајта: <https://webpath.med.utah.edu/NEOHTML/NEOPL030.html>)

1.1.4.5. Микроскопске карактеристике малигнух ћелија

Гледано под објективом микроскопа малигне ћелије имају атипичну структуру, са поремећеним односом једро-цитоплазма (*Слика 5*). Обзиром да имају како је раније наведено изражену метаболичку активност ове ћелије под микроскопом имају велика једра а неретко и мегаједарне структуре.



Слика 5. Шематски приказ разлике између здравих и малигно измењених ћелија (модификовано са сајта: <http://valleywatch.net/?p=4188>)

У оквиру једра хроматин је згрудван, неравномерно распоређен, смештен на периферији. Разуме се да малигне ћелије имају висок митотски индекс па у оквиру ћелије је могуће видети већи број једара зато што цитоплазма не стиже да се том брзином подели. У микроскопском смислу карактеризација једараца у смислу повећања броја, величине (повећање за 5 микрона у пречнику) и изгледа има индикативни карактер за малигнитет (2). Феномен контактне инхибиције, који је иначе зступљен код здравих ћелија, се овде губи зато што је и ћелијска мембрана измењена (26). Малигне ћелије су развиле механизме да измене свој енергетски метаболизам, у циљу повећане потребе за енергијом коју намеће стална пролиферација (27). Процес пролиферације малигнућелија не подлеже

постојећим регулаторним процесима ћелије. Ове ћелије самостално производе факторе раста, повећавају ниво рецептора на мембрани, активирају сигналне путеве укључене у контролу раста ћелија (27). Малигне ћелије успевају да узбегну процес апоптозе, обично губитком функције одређених протеина укључених у процес апоптозе, повећањем експресије антиапоптотских или смањењем експресије проапоптотских молекула (27, 28). Будући да су малигне ћелије стално у процесу пролиферације оне су развиле и механизме којима одржавају стабилност теломера преко високо експримованих ензима теломераза (29). Паралелно са процесима пролиферације долази до процеса неоангиогенезе а повећане енергетске потребе се превазилазе тако што малигне ћелије производе енергију ферментацијом глукозе, и да би 35% редукована ћелијска респирација нормалних ембрионалних ћелија резултирала тиме да оне пређу са оксидативног метаболизма на ферментацију (30). Анаеробни метаболизам глукозе у лимфним и крвним судовима први је корак неопластичног процеса, јер она загађује непосредну околину, што прави предуслов да малигне ћелије буду препознате од стране имунског система домаћина. Раније описан процес неоангиогенезе туморских ћелија је подстакнут секрецијом фактора неоангиогенезе које луче саме малигне ћелије (31, 32) Основне карактеристике малигнућелија инвазивност, способност насељавања околних ткива, настају као резултат слабења међућелијских веза, лучења протеолитичких ензима и металопротеиназа које разграђују међућелијски матрикс и олакшавају продирање малигнућелија у околна ткива (32, 33).

1.1.4.6. Класификација тумора дојке

Класификација тумора дојке заснива се првенствено на основу њиховог хистогенетског порекла, а онда у оквиру сваке групе постоји класификација према инвазивности, хистоморфолошким, хистохемијским и биолошким особинама (Scarff и Torloni, 1968). Неопходно је дијагностиковање тумора различите хистогенезе, као и различитих хистолошких типова у оквиру једне хистогенетске групе, јер се они међусобно разликују по свом биолошком понашању, због чега су и терапијски приступи различити. Према Светској здравственој организацији (World Health Organization - WHO) сви карциноми дојке се класификују у две велике групе: неинвазивни и инвазивни карциноми дојке (*Табела 1*).

Табела1. Хистолошка класификација тумора дојке према светској здравственој организацији

I Епителни тумори

1. бенигни (интрадуктални, аденомбрадавице, тубуларни аденом)
 2. малигни- карциноми
-

a. неинвазивни

- дуктални in situ
 - лобуларни in situ
-

b. инвазивни

- дуктални инвазивни
- дуктални инвазивни са доминантним дукталним компонентом
- лобуларни инвазивни
- муцинозни
- медуларни
- папиларни
- тубуларни
- аденоцистични
- секреторни
- апокрини
- карциномисаметаплазијом

II Мешовити тумори

1. бенигни(фиброаденоми и филодни тип)
 2. малигни(филодни карциносарком)
-

III Мезенхимни тумори

2. бенигни
3. малигни саркоми(лејомиосарком, липосарком и ангиосарком)

IV Туморске лезије

1. дуктектазије
 2. инфламаторни псеудотумори
 3. хамартоми и
 4. гинекомастија
-

1.1.4.7. Патохистолошка тумачења карцинома дојке - TNM класификација

Патохистолошке претраге умају кључног утицаја у резултатима лечења карцинома дојке. Савремена онколошка, хируршка и епидемиолошка испитивања стављају акценат на патохистолошки препарат-РН, и уносе нове маркере и појмове, а самим тим и нови приступ у тумачењу резултата патохистологије. TNM класификација подразумева опис тумора (Т-величина, N-број и захваћеност регионалних лимфних чворова, М-присуство метастатских депозита). Са порастом брија иза сваке ознаке расте и степен раширености болести. Актуелна ревизија TNM класификације, као најзначајније факторе наводи: стадијум туморске болести (TNM), резидуални статус (R), захваћеност и/или удаљеност тумора од циркуферентне ресекционе линије (CRM), присуство туморских депозита (TD), васкуларне инвазије (V), перинеуралне инвазије (PN) и степена регресије тумора (TRG) (34). (Слика 6).

Тумор	T0/Tis	T1	T2	T3	T4
Величина тумора	T0: нема тумора Tis: тумор ограничен на дуктус и лобус	0-2 cm	2-5 cm	>5 cm	Тумор било које величине који прелази зид гр коша и коже и инфламирани карцином дојке
Чворови	N0	N1	N1mi	N2	N3
	Нема лимфних чворова	Малигно измењена 1-3 чвора из пазуха	Лимфни чвор тумор више од 2мм	Малигно измењено 4-9 чворова у пазуху	Измењено више од 10 чворова у пазуху или позитивне супра и инфраклавикуларне жлезде
Метастазе	M0	M1			
	Без доказа о метастазама	Присутне удаљене метастазе			

Слика 6. TNM класификација (модификовано са сајта:

<https://www.slideshare.net/sarwatmisbah/tnm-classification-of-breast-carcinoma>

Здраве и малигне ћелије дојке поседују рецепторе за хормоне и факторе раста од којих су најбитнији: естрогенски (ER), прогестеронски (PR) и рецептор за хумани епидермални

фактор раста, HER 2 (енгл. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). Тависно од степена експримираности горе наведених рецептора и патохистолошки извештаји се разликују и приступ пацијентима је индивидуалан. Посебни, прогностички најнеповољнију категорију представљају такозвани троструко негативни тумори (Triple Negative Breast Cancer). Ови тумори су најагресивнији нај резистентнији на све методе терапије и баш мод њих би примена препарата платине могла бити од кључне важности. Највећи карцинома дојке, око 75%, на својој мембрани експримира знатне количине рецептора за естроген, зато их називамо естроген позитивни (ER+), око 65% су прогестерон позитивни тип (PR+). Уколико имају оба рецептора онда је то ER+/PR+ фенотип (60%) и они добро реагују на хормоналну терапију (нпр. тамоксифен), аналогно томе ER-/PR- у 5-10% случајева повољно одговарају на терапију (35). Осим горе наведена два рецептора 1985. Године је откривен битан рецептор за фактор раста, HER-2. Овај протеин је производ активности Erb B2-гена и идентификује се код 20% карцинома дојке. То је протоонкоген, који је лоциран на хромозому 17. HER-2 (хумани епидермални фактор раста) је део фамилије гена који регулишу ћелијски раст (36). Код карциномске болести дојке сусрећемо се са повећаном експресијом горе наведеног гена што за резултат има измене у регулацији ћелијске деобе и раста (37). Број рецептора фактора раста је у директној сразмери са степеном пролиферације и агресивности тумора а са друге стране је обрнуто пропорционалан сензитивности на хемио- и хормонску терапију. Спољашњи крај рецептора је експримиран на површини ћелије карцинома дојке, док се унутарћелијски ензим тирозин киназа везује са унутрашње стране за рецептор. Описана су три лиганда за HER-2 рецептор, укључујући HER-1, или епидермални фактор раста (EGFR), HER-3, и HER-4. Тирозин киназа HER-2 је активирана везивањем фактора раста за ове кључне тачке и тако за последицу имамо „укрштено активирање” HER-2 киназе и то се имунохистохемијски може измерити (38).

1.1.4.8. Молекуларна биологија и карцином дојке

У разумевању комплексности у откривања и адекватног лечења карцинома дојке велику улогу има напредак молекуларне биологије. На почетку два су круцијална модела за настанак карцинома дојке. Први, модел по коме се претпоставља да свака ћелија има потенцијал да постане малигна тзв. „клонална еволуциона хипотеза“. Према другој теорији претпоставља се да свако ткиво има тзв. канцерске матичне ћелије одговорне за настанак и

прогресију туморског ткива. према којој је свака ћелија ткива дојке подложна мутацијама, које јој омогућавају пут ка бесмртности, односно канцерогености. Према другој хипотези претпоставља се да у сваком ткиву постоје туморске матичне ћелије и да је ова врста ћелија одговорна за иницијацију и прогресију туморског ткива (39). Резултати брохних студија показују да је за настанак карцинома потребно само 4-7 мутација гена (40). Обзиром на горе наведене чињенице и узимајући у обзир да се број мутација у геномима броји хијадама а само поједине ћелије буду специфично погођене и специфични ген је мутиран студије показују да постоји посебна група ћелија за које би се могло рећи да су преканцерозне зато што испољавају тзв. “мутатор фенотип”, којим се обезбеђује селекција клонова и еволуција тумора (41). Да ли ће стање повећане мутабилности резултирати оштећењем ћелије и следствене апоптозе тј. негативне клоналне селекције, или ће доћи до опстајања “мутатор фенотипа” питање је на које многе студије покушавају да дају одговор. Бројни су резултати који говоре да за настанак карцинома и није неопходно стање хипермутабилности са једне стране а и мутације на генима одговорним за очување интегритета ДНК су са ниском учесталости (42).

Описано је више ганских мутација које се доводе у везу са појавом карцинома дојке. Са друге стране на све особе са мутацијама не добијају карцином дојке. Напредна молекуларна биологија даје резултате да 10% пацијената у једном периоду живота има могућност да оболи од карцинома дојке (43). Коказано је да кључну улогу у иницијацији карцинома дојке имају мутације на p53, BRCA1 и BRCA2 генима. Гени BRCA1 и BRCA2 су битни за нормално функционисање ћелија, јер учествују у контроли процеса раста ћелија и механизмима репарације ДНК. Мутације ових гена могу бити карактеристичне за одређена поднебља, породице исл. На пример, мутација 5382insC у 20 екзону гена BRCA1 је специфична мутација код словенске популације. Жене носиоци ове мутације су са већом вероватноћом за појаву карцинома дојке и јајника а могу ризик пренети и на потомство. Носилац ове мутације има повећан ризик за настанак карцинома дојке и јајника и велика је вероватноћа да ће мутацију пренети на потомство. Студије су показале да жене са овим мутацијама (у BRCA1 или BRCA2 гену) имају 85% вероватноћу да добију карцином дојке до седамдесете године живота односно 62% када је у питању карцином јајника (44).

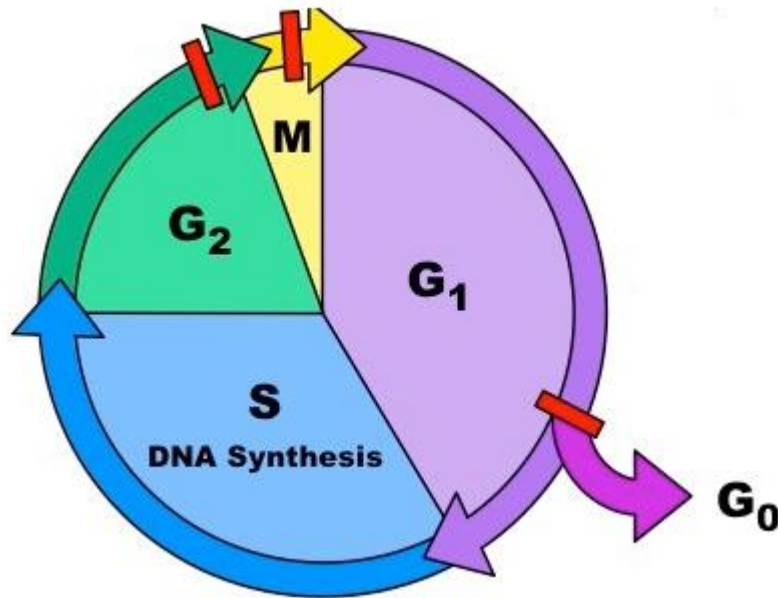
BRCA 1 ген је који је описан 1994. године. Има централну улогу у одржавању стабилности генома, репарацији ДНК, контроли ћелијског циклуса, моделирању хроматина, регулацији транскрипције и убиквитинације протеина. Учествоје у поправци оштећене ДНК тако што укључује хомологу рекомбинацију (45). Не самостално већ и у садејству са другим протеинима у склопу комплекса BASC (енгл. BRCA1 associated genome surveillance complex), BRCA1 учествује у репарацији ДНК. Досадашња истраживања су доказала више стотина, преко 300 мутација овог гена и обично се налазе у породицама са дијагностикованим карциномима дојке или јајника (46). BRCA2 ген је смештен на 13. хромозому описан 1995. године. У великој мери је експримиран у ткиву дојке, тимуса, нешто мање плућа, јајника и слезине. BRCA2 је укључен у поправку једноланчаних и дволанчаних оштећења ДНК и учествује у цитокинези. До сада је описано преко 800 мутација овог регулаторног гена (47).

1.2. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус представља процес прецизно регулисаних догађаја који као резултат има деобу ћелије. Састоји се од два периода, период интерфазе и период деобе. Интерфаза представља раздобље између две деобе и чини је G1, S, и G2 фаза ћелијског циклуса. У овој фази ћелија расте и припрема се за дебу (енгл. *Mitosis*) и репликацију ДНК. Уколико ћелије привремено зауставе процес деобе, онда се налазе у G0 фази у којој могу остати краће или дуже а неретко и трајно. Бројни су регулаторни механизми овог циклуса а у томе важну улогу играју циклини, циклин зависне киназе и инхибитори циклин зависних киназа (48). Циклини су група протеина која је по структури слична и стварају се и деградирају у различитим фазама ћелијског циклуса. Функционишу тако што граде комплексе са са циклин зависном киназом (енгл. *cyclin dependent kinases*, Cdk) ензим из фамилије серин/треонин киназа. Аналогно циклинима и ове киназе имају различиту активност како ћелија напредује кроз ћелијски циклус (49). До сада је откривено девет Cdk (Cdk1- Cdk9), са до сада неоткривеном улогом и ћелијском циклусу у потпуности. Са друге стране откривен је и велики број цилина (циклин А-циклин Т). Да би награђен комплекс са Cdk и циклином, потребна је фосфорилација одређених места на кинази (50).

Контролни систем регулише напредовање кроз ћелијски циклус на три основне тачке:

1. Прва је тачка Start (restriction point) у касној G1 фази када се ћелија припрема за дупликацију хромозома и прелазак у S фазу. Контролни механизми у овој тачки одлажу дупликацију хромозома уколико постоје оштећења ДНК настала нпр. зрачењем или дејством неких хемијских материја. Овим се ћелији оставља времена за исправку насталих оштећења.
2. Друга контролна тачка налази се на преласку из G2 у М фазу. У овој тачки контролни систем детектује грешке у ДНК настале неадекватном синтезом у S фази и тако омогућава да по извршеној деоби свака ћерка ћелија има пун сет хромозома. Уколико је дошло до непотпуне репликације ДНК шаљу се одговарајући сигнали контролном механизму и ћелијски циклус се прекида док се репликација не заврши и док се последњи нуклеотид не ископира.
3. Трећа контролна тачка налази се на преласку Метафазе у Анафазу где се контролише раздвајање сестринских хроматида. Да би ћелија ушла у Анафазу потребна је адекватна припрема за раздвајање хроматида. У овој контролној тачки постоје „сензори,, који прате стање кинетохоре, специјализованог места на хромозому којим се они каче на микротубуле деобног вретена. Уколико нека кинетохора није правилно закачена, шаље се сигнал контролном систему ћелијског циклуса који блокира одвајање ћелијских хроматида (51). *(Слика 7)*



Слика 7. Схематски приказ фаза ћелијског циклјуса са контролним тачкама (модификовано са сајта: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-checkpoints.html>)

Да би ћелијски циклус напредовао у појединим фазама циклуса цилини морају интерреаговати са киназама:

- Напредовање кроз G₁ фазу- циклин D са Cdk2, -4, и -6
- Прелаз из G₁/S фазу- циклин E са Cdk2 је активна на прелазу и усмерава улазак у S фазу ћелијског циклуса.
- Напредовање кроз S фазу- A/Cdk2,
- G₂ фаза је регулисана комплексом циклин A и Cdk1
- Митоза је регулисана Cdk1/циклин B је неопходан за покретање митозе.

Осим горе наведених механизма и регулацији ћелијског циклуса велику улогу ма и низ тзв. инхибитора циклин зависних киназа (инхибитори Cdk). Они су практично негативни регулатори и заправо заустављају циклус тако што онемогуће напредовање циклуса у даљу фазу. Постоји више класа ових инхибитора нпр. Ink4, p16, p15, p18 и p19, блокирају

циклин D-зависне киназе (Cdk2, -4 и -6). CIP/Kip (енгл *kinase inhibitor protein KIP*), p21, p27 и p57, инхибира циклин E/Cdk2 и циклин A/Cdk2 (52, 53).

1.2.1. G1/S фаза ћелијског циклуса

Без обзира на то што се назива фаза мировања, G0 је ипак период у коме ћелоја испољава одређене активности. Да би се активирала и ушла у ћелијски циклус ћелија мора да прође тзв. тачку преласка која у регулаторном смислу предтсвља границу између ране и касне фазе ћелијског циклуса (54). Пролаз ћелије кроз ову фазу циклуса је регулисан протеином ретинобластома (енгл. *retinoblastoma tumor suppressor gene product*, Rb). Ген Rb1 представља тумор супресорски ген изпрва откривен у малигном тумору ретине. Фамилија Rb протеина се састоји од Rb/p105, p107 и Rb2/p130. Овај протеин узима учешће у регулацији пролиферације ћелија, диференцијације и апоптозе. Молекул pRb такође игра централну улогу у процесима диференцијације у различитим ткивима, укључујући очи, сочиво, мозак, периферни нервни систем, епидермис, меланоците, косу, мишиће и јетру. Када је активан, хипофосфорилиран, Rb блокира улазак у S фазу. Активност овог протеина је контролисана фосфорилацијом помоћу Cdk4/6-Циклина D и Cdk2/Циклин E (55). Уколико је делимично фосфорилисан Rb је у станју да покрене гене за синтезу циклина E који у комплексу са Cdk2 хиперфосфорилише Rb што за резултат има експресију гена за протеине S фазе. Ако се не испуне сви услови за ћелијску деобу онда ћелија улази у фазу мировања и активирају се контролни механизми (*G1 checkpoint*). У G1 фази, ДНК је осетљива на зрачење, хемијске, физичке ноксе или оксидативни стрес. Да би напредовала S фаза напред наведен комплекс циклин A/Cdk2 је потребно да активира транскрипциони фактор E2F (56-58). У касној S и у читавој G2 фази, врши се припрема за митозу повећањем нивоа циклина A и B. Појава оштећења на нивоу молекула ДНК у G1 фази повећава ниво активности фактора транскрипције p53 а овај процес има за резултат повећану синтезу инхибитора циклин зависних киназа, p21, а он са друге стране инхибира комплексе циклина/Cdk у G1 фази ћелијског циклуса. Фактор p53 може и да

иницира систем за репарацију ДНК. Али ако је оштећење ДНК неповратно, p53 активира апоптозу иницирањем сигнала са Fas рецептора или преко фамилије протеина Bcl-2 (59,60).

1.2.2. G2/M фаза ћелијског циклуса

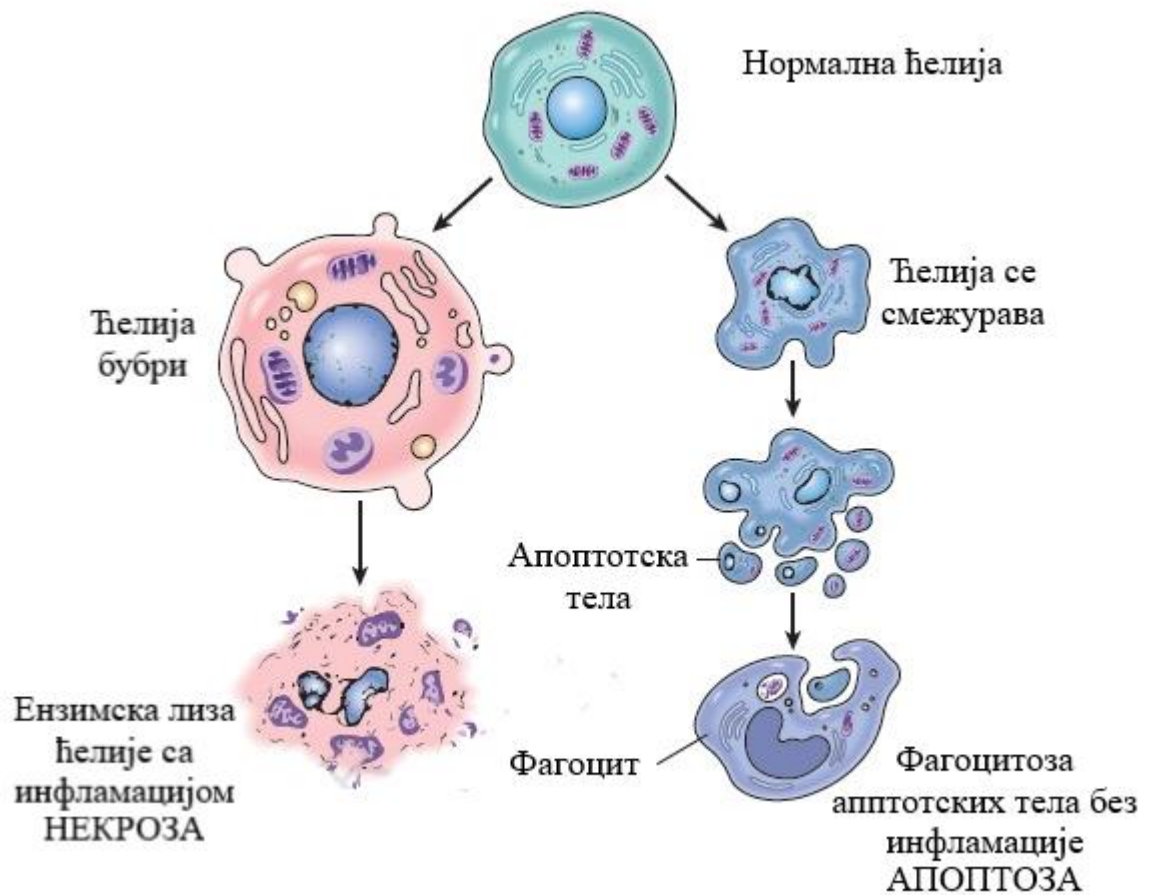
G2 фаза је период пред улазак у митозу. У овој фази се врши синтеза протеина потребних за митозу па аналогно томе уколико дође до инхибиције њихове синтезе, доћи ће и до инхибиције митозе. У овој фази је и број хромозома дупло већи. Улазак из G2 у M фазу омогућују циклин-A2 и -B1, који се везују у комплексе са Cdk2 и Cdk1. Ови комплекси изазивају кондензацију хромозома и лизу једарне мембране. Cdk1 је есенцијални молекул, и заправо, нема података о преживелим Cdk1^{-/-} мишевима или ћелијама (61). Циклин A2 узима учешће у две фазе циклуса, на прелазу G1/S и у току митозе. Циклини- B1 и- B2 у комплексу са Cdk1 се налазе у ћелијама које расту. На пример циклин B2 је изражено експримиран током сперматогенезе (62). Ако дође до дефекта у хромозомима активира се контролна тачка G2, која инхибира активност циклин B/Cdk1. Протеин p53, активацијом p21 протеина, зауставља ћелијски циклус у G2 фази (63). Уколико дође до оштећења молекула ДНК, циклус се зауставља у било којој фази, са циљем да се поправи ово оштећење или активира апоптотске механизме што последично води ћелију у смрт (64).

1.3. Типови ћелијске смрти

Раст, развој и нормално функционисање вишећелијских организама не зависи само од стварања ћелија већ и од њиховог уништења. Постојаност величине ткива се управо постиже захваљујући једнаком обиму процеса настанка нових и смрти старих ћелија. Ћелијска смрт има вишеструке корисне улоге у одржавању хомеостазе организма. Ћелије подлежу механизмима смрти у ситуацији када су оштећене, инфициране или малигно измењене чиме се спречава нарушавање физиолошког морфофункционалног стања ткива (65).

1.3.1. Апоптоза

Смрт ћелије не настаје као случајан процес, већ подразумева одвијање програмираног редоследа молекулских догађаја у којима ћелија систематски уништава саму себе након чега бива фагоцитована од стране других ћелија не остављајући за собом траг. У већини случајева програмирана ћелијска смрт настаје апоптозом-од грчке речи која значи "опадање (лишћа са дрвета)". (Слика 8)



Слика 8. Схематски приказ разлике између апоптозе и некрозе (модификовано са сајта: <https://tinycards.duolingo.com/decks/4EhJvAVS/apoptosis-vs-necrosis>)

Током апоптозе ћелија се морфолошки мења, смежурава се, цитоскелет јој се разграђује, једро се фрагментише а једарни хроматин кондезује (66). Резултат ових промена је бубреће ћелије и њена подела на мембраном ограничене фрагменте назване апоптотска телшца. Овако измењена ћелија има другачију хемијску структуру која олакшава макрофазима да је фагоцитују. Процес фагоцитозе одвија се довољно брзо да спречи да ћелијски садржај дође у контакт са екстраћелијским простором и суседним ћелијама и изазове инфламаторну реакцију (67). Током раста и развоја организма али и у ткивима одрасле јединке, велики број ћелија умире апоптозом. Многе од ових ћелија у тренутку отпочињања апоптозе су потпуно здраве, неке чак отпочињу са програмираном ћелијском смрти одмах након формирања. Разлози за ово су вишеструки. Ћелија ће отпочети програм ћелијске смрти уколико, захваљујући контролним механизмима, установи да постоји било каква грешка у њеној структури која ће јој онемогућити несметано функционисање или је претворити у опасност за организам. Пример су аутореактивни Т и Б лимфоцити, који бивају уклоњени апоптозом уколико се на њима експримирају структурно неадекватни антген-специфични рецептори.

Ћелија препознаје неправилности у функционисању својих органела. Уколико су она велика покреће се процес апоптозе. Слично се дешава и у случају оштећења ДНК. Уколико се контролним механизмима ћелијског циклуса открије постојање неке грешке у молекулу ДНК коју ћелија није у стању да исправи, она отпочиње процес програмиране ћелијске смрти. На овај начин апоптоза постаје заштитни механизам за спречавање настанка мутација и тумора (68).

1.3.1.1. Каспазе као контролори апоптозе

Апоптозу активирају протеини из фамилије каспаза. Ови протеини се у ћелији синтетишу у неактивном облику и активни су само током апоптозе. Везивањем цистеина за њијово активно место, каспазе се активирају и разграђују интраћелијске протеине, доводећи до структурних и функционалних промена које воде у ћелијску смрт. Каспазе разграђују протеине на специфичним секвенцама, на месту везивања аспарагинске

киселина по чему су и добиле име (*енг. caspases - c за цистеини , asp - за аспарагинске киселине*) (69).

Постоје две велике групе каспаза – иницијаторске и ефекторне, односно оне које започињу апоптозу и оне које је спроводе.

Иницијаторске каспазе у цитоплазми се налазе у неактивном мономерном облику. Њихова основна улога је да активирају ефекторе каспазе. Апоптотски сигнал индукује спајање каспазних мономера у велике комплексе у оквиру којих долази до повезивања каспаза у димере чиме постају активне протеазе. Каспазе у димерским паровима међусобно, разградњом специфичних протеинских компоненти, откривају активна места што је кључно за њихову активацију и протеолитичку активност. Овако активирани иницијаторске каспазе активирају ефекторске доводећи до конформационе промене у њиховом активном месту. Један комплекс иницијаторских каспаза може активирати више ефекторских што појачава каскадну реакцију. Ефекторске каспазе разлажу различите протеине ћелија, нарушавају њену грађу и функцију доводећи до њене смрти.

Постоји велики број циљних протеина који се разграђују на овај начин. За сада су најбоље проучени нукелусни ламинин и протеини који инактивирају нуклеусне ендонуклеазе и спречевају њима посредовану разградњу ДНК. Поред ових зна се да ефекторске протеазе разлажу и протеине цитоскелета и адхезине. На овај начин структурно измењена ћелија у апоптози бива одвојена од суседних што олакшава њену фагоцитозу (70).

Процес активације каспаза је иреверзибилан. Једном активирани доводе до неповратне деградације ћелијских протеина и овај процес се не може зауставити или вратити на почетак.

Иницијаторске каспазе активирају се на два начина – спољашњи и унутрашњим (митохондријалним) путем.

1.3.1.2. Спољашњи пут активације иницијаторских каспаза

Спољашњи пут активације отпочиње везивањем екстрацелуларног лиганда за трансмембранске рецепторе. Ови рецептори, названи рецептори смрти су хомотримерни

молекули који се састоје из три једнака дела: ванћелијски, за који се везује сигнални молекул, трансмембрански и интраћелијски део којим се сигнал смрти преноси на интраћелијске активатора апоптозе. Рецептори припадају фамилији рецептора фактора некрозе тумора (TNF). Лиганди који активирају рецепторе смрти такође су хомотримерни молекули и припадају TNF фамилија сигналних протеина (71). Везивањем лиганда за рецептор, интрацелуларни сегмент рецептора везује адапторни протеин на који се везују иницијаторске каспазе ц (најпре каспаза 8) са последичним стварањем сигналног комплекса смрти (*death-inducing signaling complex* DISC). Иницијални процес у овом комплексу је димеризација каспаза које врше иницијацију, њихове међусобне активације протеолизом у p10 и p18 субјединици и стварање активних хетеротетрамерних ензима. Активирана каспаза 8 се отпушта у цитоплазму где активира ефекторске каспазе.

Најбоље проучен модел апоптозе изазване на овај начин јесте активација апоптозе спољашњим путем преко Fas рецептора на циљној ћелији за које се везује Fas лиганд експримиран на цитотоксичним лимфоцитима.

Fas рецептор (FasR), познат и као апоптозни антиген 1 (APO-1 или APT) члан је фамилије фактора некрозе тумора (TNF) рецептора. Кодирањем је FAS геном који се налази на хромозому 10. Алтернативним сплајсовањем овог гена (процес којим се РНК екسونи произведени транскрипцијом гена – пре РНК, поново спајају на више начина током РНК сплајсовања) настаје седам изоформи овог протеина од којих трансмембрански протеин задужен за апоптозу представља изоформу 1. Друге изоформе овог протеина су доста ретке и често су удружене са различитим болестима.

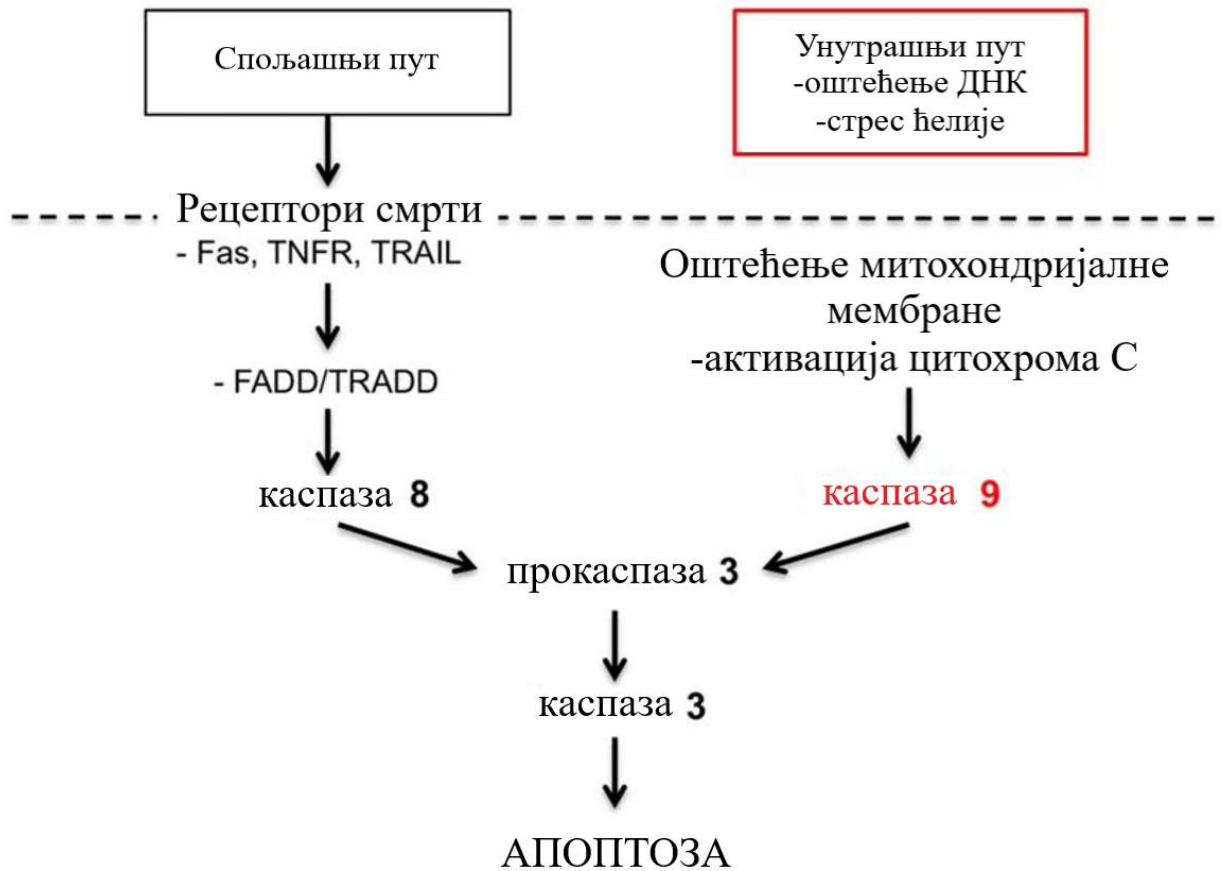
Многе ћелије производе протеине који делују као инхибитори апоптозе. Пример је протеин FLIP. Он се димеризује са каспазом 8 у DISC-у, изостаје протеолиза на локацијама p10 и p18 која је неопходна за стабилну активацију ензима и апоптотски сигнал бива блокиран.

1.3.1.3. Унутрашњи пут активације

Ћелија под утицај различитих стресних чиниоца као што су недостатка фактора раста, радијације, цитотоксичних агенаса, хипоксије покреће унутрашњи пут активације

апоптозе. Он се још назива и митохондријални пут јер се темељи на отпуштању митохондријалних протеина у цитоплазму. Ослобођени протеини активирају каспазну протеолитичку каскадну реакцију и воде ћелију у смрт. Кључни протеин митохондрија који делује на овај начин је цитохром С. Он је хидросолубилна компонента транспортног ланца електрона у митохондријама, где има улогу у преносу електрону неопходних за стварање АТП-а. Отпуштен у цитоплазму овај протеин везује се за адапторни протеин који се назива Араф1 (*apoptotic protease activating factor-1*). Настаје формацију која има изглед сличан точку и зове се апоптозом. За адапторни протеин у апоптозому везује се иницијаторска каспаза 9, активира се слично каспаси 8 у склопу DISC-а и каскадно активира ефекторске каспазе (72).

Постоје строги механизми контроле интрацелуларног пута активације апоптозе. Њихов циљ је да ћелија умре само онда када је то потребно. У овим механизмима главна улога припада Bcl2 фамилији протеина који контролишу отпуштање цитохрома С и других митохондријалних протеина у цитоплазму. Уколико стимулишу отпуштање цитохрома С, Bcl2 протеини се понашају као про-апоптотски медијатори, док спречавањем ослобађања остварују анти-апоптотски ефекат. Када се про- и анти-апоптотски Bcl2 протеини вежу један са другим међусобно неутралишу своје функције. Због тога равнотежа између активности ове две класе Bcl2 протеина умногоме одређује да ли ће ћелија да остане у животу или не. (*Слика 9*)



Слика 9. Схематски приказ путева активације апоптозе (модификовано са сајта: <https://www.eneuro.org/content/3/4/ENEURO.0150-16.2016>)

Про-апоптотска класа Bcl2 фамилије протеина се састоји од две подфамилије – ефекторске Bcl2 фамилије протеина и BН3-само протеина. Главни ефекторни протеини су Вах и Вак који су структурно слични са Bcl2 протеинима осим што не поседују BН4 домен. За разлику од њих једина сличност између BН3-само протеина и Bcl2 фамилије је управо BН3 домен.

Када апоптотски стимулус подстакне унутрашњи апоптотски пут подфамилија ефекторских протеина се активира, образује олигомере на спољашњој мембрани митохондрија и стимулише ослобађање цитохрома С (и других интермембранских протеина) још увек непознатим механизмом. За започињање унутрашњег пута апоптозе је неопходна активност барем једног од два главна ефекторска протеина Вах или Вак. То су

потврдила истраживања на мишевима код којих недостатак оба ефекторска протеина изазива неосетљивост на било који про-апоптотски сигнал. Док се је Bак везан за спољашњу мембрану митохондрија чак и у одсуству апоптотског стимулуса, Вах се углавном налази у цитосолу и прелази у митохондрије само у случају апоптотског сигнала. Активација Вах или Bак протеина обично зависи од ВНЗ протеина.

Анти-апоптотски Bcl2 протеини као што су Bcl2 и BclX_L се такође налазе на спољашњој митохондријалној мембрани како би спречили неодговарајуће ослобађање интермембранских протеина. Анти-апоптотска Bcl2 фамилија протеина зауставља апоптозу најчешће везивањем за и инхибицијом про-апоптотских Bcl2 протеина. Везивањем за Bак не дозвољавају његову олигомеризацију и тиме ослобађање цитохрома С и других интермембранских протеина. До сада је откривено 5 анти-апоптотских Bcl2 фамилија протеина од којих је макар једна потребна ћелији да преживи.

ВНЗ-само протеини су највећа подфамилија Bcl2 фамилије протеина. Ћелија може да их ствара и активира у одговору на апоптотски стимулус. Сматра се да подстичу апоптозу пре свега тако што неутралишу дејство анти-апоптотске Bcl2 фамилије протеина. То постижу везивањем за анти-апоптотску Bcl2 фамилију протеина преко свог ВНЗ домена. На овај начин се омогућава спајање Вах или Bак протеина на површини митохондрија што узрокује отпуштање интермембранских протеина који започињу апоптозу.

ВНЗ-само протеини представљају главну спону између апоптотског стимулуса и унутрашњег пута апоптозе, при чему различити стимулуси активирају различите ВНЗ протеине. Неки ванћелијски сингали преживљавања блокирају апоптозу инхибицијом синтезе и активности неких ВНЗ-само протеина. Слично томе, у одговору на ирверзибилно ДНК оштећење, повећава се концентрација p53 тумор супресор протеина чиме започиње транскрипција гена који кодирају синтезу ВНЗ-само протеина типа Рума или Noxa. Ове врсте ВНЗ-само протеина потом активирају унутрашњи пут апоптозе чиме уклањају потенцијално малигну ћелију.

У неким ћелијама спољашњи апоптотски пут активира унутрашњи како би се појачано стимулирала каспазна каскада и тиме олакшала и убрзала смрт ћелије. Везу између ова два пута апоптозе омогућава врста ВНЗ-само протеина назван Bid. Овај протеин је нормално неактиван, али када рецептори смрти започну спољашњи пут

апоптозе, иницијаторска каспаза (каспаза 8) активира Bid који прелази на спољашњу мембрану митохондрија и инхибира анти-апоптотску Bcl2 фамилију протеина. Ови процеси у крајњем појачавају апоптотски сигнал.

1.3.1.4. Контрола каспазне активности

Будући да активација каспаза узрокује апоптозу, ћелија поседује комплексне заштитне механизме који осигуравају да се ове протеазе активирају само у пожељно време. Прву линију ове одбране представља фамилија протеина под називом инхибитори апоптозе (*inhibitors of apoptosis, IAPs*). Ови протеини су први пут откривени у неким вирусима инсеката који преко *IAPs* спречавају да ћелија домаћина подлегне апоптози.

Сви инхибитори апоптозе поседују један или више домена (BIR домени) посредством којих се везују за каспазе и инактивишу их. Ипак, код мушица рода *Drosophila* је утврђено постојање протеина који блокирају дејство инхибитора апоптозе (анти-*IAPs* протеини) од којих су најпознатији *Reaper*, *Grim*, и *Hid* анти-*IAPs* протеини. Они се везују управо за BIR домене инхибитора апоптозе и на тај начин спречавају везивање *IAPs*-а за каспазе. У случају делеције гена који кодирају поменуте врсте анти-*IAPs* протеина апоптоза се зауставља и обрнуто. Код мушица је зато процес апоптозе регулисан прецизном равнотежом између дејства *IAPs* и анти-*IAPs* протеина (73). Код сисара је однос *IAPs* и анти-*IAPs* протеина много мање познат. Истраживања на мишевима су указала да се анти-*IAPs* ослобађају из међумембранског простора митохондрија као одговор на започињање апоптозе. Они потом блокирају *IAPs* и стимулишу наставак апоптотског процеса. Међутим студије на истим анималним моделима су показале да се мишеви којима недостаје главни *IAPs* (XIAP) или неки од анти-*IAPs*-а (*Smac/Diablo* и *Omi*) нормално развијају.

Све ово наводи на закључак да се код различитих врста организама контрола каспазне активности одвија на другачији начин.

1.3.1.5. Екстрацелуларни фактори преживљавања инхибрају апоптозу

Међућелијска комуникација поред многих ћелијских активности регулише и апоптозу. Ови екстрацелуларни сигнални процеси чине део нормалних контролних фактора који обезбеђују да појединачне ћелије функционишу за добробит ткива и организма у целини. У овом случају стимулишу преживљавање или смрт ћелије у зависности од потребе. То објашњава постојање сигналних молекула који активирају апоптозу и других који је инхибирају. Као што је поменуто FAS лиганди активирају рецепторе смрти чиме се започиње спољашњи пут апоптозе. Значај ових сигналних молекула код кичмењака се нарочито огледа током процеса развоја организма. Код мишева локално синтетисани сигнални молекули стимулишу апоптозу ћелија између прстију шака и стопала и тако омогућавају њихово правилно обликовање.

Са друге стране сигнални молекули који спречавају апоптозу су такође важни и називају се фактори преживљавања. Већина животињских ћелија захтева континуирану сигнализацију из других ћелија како би избегле апоптозу. Оваква међу контрола помаже да ћелије преживе само када и где је то потребно. Дobar пример за ову међућелијску регулацију су нервне ћелије које се стварају у вишку током развоја нервног система, а затим конкуришу за ограничене количине фактора преживљавања које секретују други типови ћелија у окружењу. Неурони које имају довољно фактора преживљавања остају у животу, док остали изумиру. На овај начин, број преживелих неурона се аутоматски подешава тако да буде адекватан броју циљних ћелија са којима се повезују.

Фактори преживљавања се уобичајено везују за рецепторе на површини ћелије и потом активирају интраћелијску сигналну каскаду која спречава одвијање програмиране ћелијске смрти. Већина ових сигналних путева делује путем регулације Bcl2 фамилије протеина. Неки фактори преживљавања стимулишу синтезу анти-апоптотичних протеина Bcl2 фамилије као што је Bcl_{X_L}. Други инхибирају функцију про-апоптотских протеина (*Bad*). Код мушица рода *Drosophila* фактори преживљавања фосфорилишу и инактивирају анти-*IAPs* протеине (*Hid*) и тако омогућавају *IAPs* протеинима да зауставе апоптозу.

1.3.1.6. Фагоцитоза апопторске ћелије

Програмирана ћелијска смрт је изузетно уредан процес. Наиме, апоптотска ћелија и њени делови не избацују свој садржај напоље већ остају нетакнути и фагоцитовани од стране суседних ћелија. С обзиром да тако не остају трагови апоптотске ћелије избегава се запаљенска реакција. Фагоцитни процес зависи од хемијских процеса на површини апопторске ћелије који активирају саму фагоцитну ћелију. Међу овим хемијским процесима се нарочито истиче расподела негативно наелектрисаних фосфолипида фосфатидилсерина на ћелијској површини. Поменути фосфолипиди се нормално налазе искључиво на унутрашњој страни липидног двослоја плазмалеме, док у апоптотској ћелији прелазе на спољашњу страну. Механизам ових догађаја није довољно познат али се претпоставља да је повезан са каспазном разградњом протеина укључених у мембранску расподелу фосфолипида. Мноштво повезујућих протеина спаја фосфатидилсерин апоптотске ћелије са специфичним површинским рецепторима суседне ћелије или макрофага чиме се започиње процес фагоцитозе.

1.3.1.7. Значај апоптозе у развоју болести

Постоји велики број болести код којих огроман број ћелија подлежу апоптози и узрокују оштећење ткива. Међу најозбиљнијима су срчани и мождани удар. У овим акутним стањима многе ћелије умиру некрозом услед исхемије, док друге улазе у процес програмиране ћелијске смрти. Синтеза каспазних инхибитора као терапеутика који блокирају апоптозу би у будућности могло да представља ефикасан терапијски приступ у очувању ћелија.

Постоје друга патофизиолошка стања у којима ћелије умиру апоптозом. Код људи и мишева мутација гена који кодирају Fas рецепторе смрти спречава нормалну смрт лимфоцита чиме се они прекомерно нагомилавају у слезини и лимфним чворовима. Овакав след догађаја може да буде узрок настанка аутоимунских болести.

Смањени степен апоптозе има важну улогу у развоју многих тумора, будући да је познато да туморске ћелије имају поремећену регулацију програмиране ћелијске смрти.

Bcl2 (*B cell lymphoma*) ген је прво изолован у лимфоцитним туморима људи. Висок ниво Bcl2 протеина у лимфоцитима подстиче канцерогенезу инхибицијом апоптозе и последично повећава број лимфоцита. Ови протеини такође смањују осетљивост туморских ћелија према антитуморским лековима. Слично томе ген који кодира p53 тумор супресор протеин је у 50% случајева тумора мутиран, тако да више не може да ефикасно стимулише апоптозу туморских ћелија. Поред тога, преживљавају и туморске ћелије са оштећеном ДНК, чиме ове ћелије услед додатних мутација постају још малигније. С обзиром да многи антутуморски лекови делују путем стимулације p53 протеина, губитком његове функције малигне ћелије постају отпорније на дејство ових лекова.

Управо чињеница да смањена апоптоза узрокује настанак многих тумора је навела на размишљање у правцу синтезе лекова који подстичу овакву смрт ћелије. То је довело до развоја хемијских агенаса који ремете функцију анти-апоптотске Bcl2 фамилије протеина као што су Bcl2 и BclXL. Ови агенси се везују високим афинитетом за хидрофобне жлебове анти-апоптотске Bcl2 фамилије протеина чиме блокирају њихову функцију. На тај начин се стимулише унутрашњи апоптотски пут који је у одређеним туморима повећао број умрлих ћелија. Већина тумора људи проистиче из епителних ткива као што су плућа, гастроинтестинални тракт, дојка и простата. Овакве туморске ћелије испољавају поремећаје функције, укључујући смањену способност да се везују за екстрацелуларни матрикс и једне са другима преко ћелијских веза.

1.3.2. Аутофагија

Аутофагија је процес током којег ћелија разграђује непотребне или дисфункционалне компоненте. Назив аутофагија потиче од грчке речи *auto* – сам и *phagein* – јести . Процесом аутофагије најпре се у ћелији формирају везикуле опасане двоструком мембраном тзв. аутофагозоми. У овим везикулама смештене су компоненте цитоплазме. У даљем току аутофагозоми се спајају са лизозомима чији ензими разграђују садржај везикуле (слика 3).

Процес аутофагије отпочиње активацијом PI3 киназа (*Phosphatidyl Inositol 3 kinase*) као одговором на недостатак храњивих материја. PI3 киназа даље активира АКТ (*серин/треонин киназе*) чиме се зауставља синтеза протеина и активира аутофагија. Осим као одговор на недостатак храњивих материја аутофагија и ћелијски катаболизам покрећу се и када постоје нагомилани реактивни облици кисеоника, хипоксија или бактеријска инфекција.

Аутофагијом ћелија заправо разграђује своје храњиве, односно, градивне састојке и омогућава сопствено преживљавање у условима када су јој нутрицијенти неприступачни.

1.3.3. Некроза

У одговору на акутне ноксе као што је трауматско оштећење ткива или хипоксија, односно, као одговор на физичка и хемијска оштећења, ћелије умиру процесом названим ћелијска некроза. У већини случајева, некроза је вероватно узрокована недостатком енергије, што за последицу има поремећај метаболизма и губитка мембранског јонског градијента. Некротична ћелије постаје едематозна, мембрана јој се разара, као и мембране органела, одвија се хидролиза ДНК, вакуализација ендоплазматског ретикулума, садржај ћелије се излива у околину и иницира инфламаторни одговор. Нарушавањем мембране лизозома отпуштају се лизозомални ензими који најпре разграђују интраћелијске а касније и екстраћелијских компоненте. Ово може изазвати ланчану реакцију у смислу захватања околних ћелија и њихову некрозу. За разлику од апоптозе која је често и користан механизам некроза то никада није и готово увек захвата велики број ћелија.

1.3.4. Некроптоза

Један облик некрозе, под називом некроптоза, је облик програмиране ћелијске смрти коју изазива специфичан регулаторни сигнала из других ћелија. Овај процес је још увек недовољно јасан и механизми његовог настанка су почели да се проучавају.

Уколико различити чиниоци (нпр. вируси) инхибирају ћелијске каспазе ћелија умире процесом некроптозе. Током некроптозе ћелијска мембрана мења своју пропустљивост при чему се садржај ћелије ослобађа ван. Такође, из ћелије излазе и молекули названи

DAMPs (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs). У крајњем ови молекули покрећу имунски одговор. Током процеса некроптозе стварају се некрозоми, структура која настаје дејством специјалних серин-треонин киназав (RIPK1 и RIPK3- *receptor-interacting protein kinase*). Ове киназе, током апоптозе, када су каспазе активне, бивају разграђене каспазом 8, због чега се некрозом не формира. Активација RIPK1 и RIPK3 најчешће се дешава преко активације TNFR1 на мембрани ћелије. Након што се за овај рецептор веже одговарајући лиганд ствара се унутарћелијски комплекс (COMPLEX I) везан за ћелијску мембрану. Он се састоји од унутарћелијског дела рецептора (TRADD молекула), везане RIP1 киназе, целуларних инхибитора апоптозе (сIAP1 и сIAP2), и два адапторна фактора TRAF2 и TRAF5 (*TNF-receptor-associated factor*, TRAF). сIAP1 и сIAP2 уводе убиквитински ланац у RIP1 и полиубиквитацијом активира RIP1. RIP1 даље активира NF- κ B транскрипциони фактор, а као крајњи исход спречава апоптозу и некроптозу. Деубиквитацију RIP1 катализира ензим цилиндроматоза (CYLD), ово дестабилизује COMPLEX I, RIP1 се отпушта у цитоплазму где бива протеализован активираним каспазама 8 што за циљ има апоптозу.

Уколико су каспазе инактивисане, RIP1 и RIP3 се везују и стварају некрозом. Некрозом реагује са молекулом RHIM (*RIP homotypic interaction motif*, RHIM), чиме настаје некроптотични сигнал. Каскадни реакцијама RIP1 активира RIP3 киназу, а она активира *MLKL* (*mixed lineage kinase domain-like protein*, MLKL) која ствара хомотримере. Ови хомотримери омогућавају улазак јона натријума и калцијума и нарушава се хомеостаза ћелије. Активацијом фосфатазе PGAM5 (*phosphoglycerate mutase 5*, PGAM5), некрозом се спаја са митохондријама, активира се Drp1 ензим GTP-азу која повећава стварање слободних радикала.

Уколико се метаболички стрес продужи ћелија умире. Када ћелија умре на овај начин (програмирана ћелијска смрт тип I) тешко је направити јасну границу- да ли је аутофагија била иницијација или ефекторна фаза ћелијске смрти.

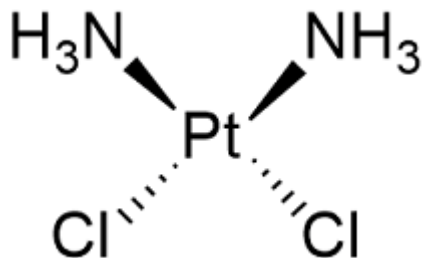
1.4. Примена комплекса платине у медицини

Употреба металних комплекса у медицини датира уназад готово 50 векова (74, 75). Базирана је на чињеници да позитивни метални јон и имају добру способност да се везују за важне биомолекуле налик протеинима, хормонима ензимима исл. Који су негативно

наелектрисани. (76, 77). Могли би смо рећи да је прекретница у разбоју неорганске хемије примењене у медицини било откриће цисплатине, 1965. Године (78, 79). У даљем току долази до откривања мноштва металних комплекса који би могли имати антитуморско деловање (80-86). Разумљиво, са појавом нових лекова јављали су се и проблеми тј. Ограничења у употреби због мноштва нежељених дејстава која углавном настају као последица нагомиланавања ових јона у организму. Зато је постављен императив да се пре синтезе металног комплекса детаљно испита његова елиминација, метаболизам а можда изнад свега његова специфичност.

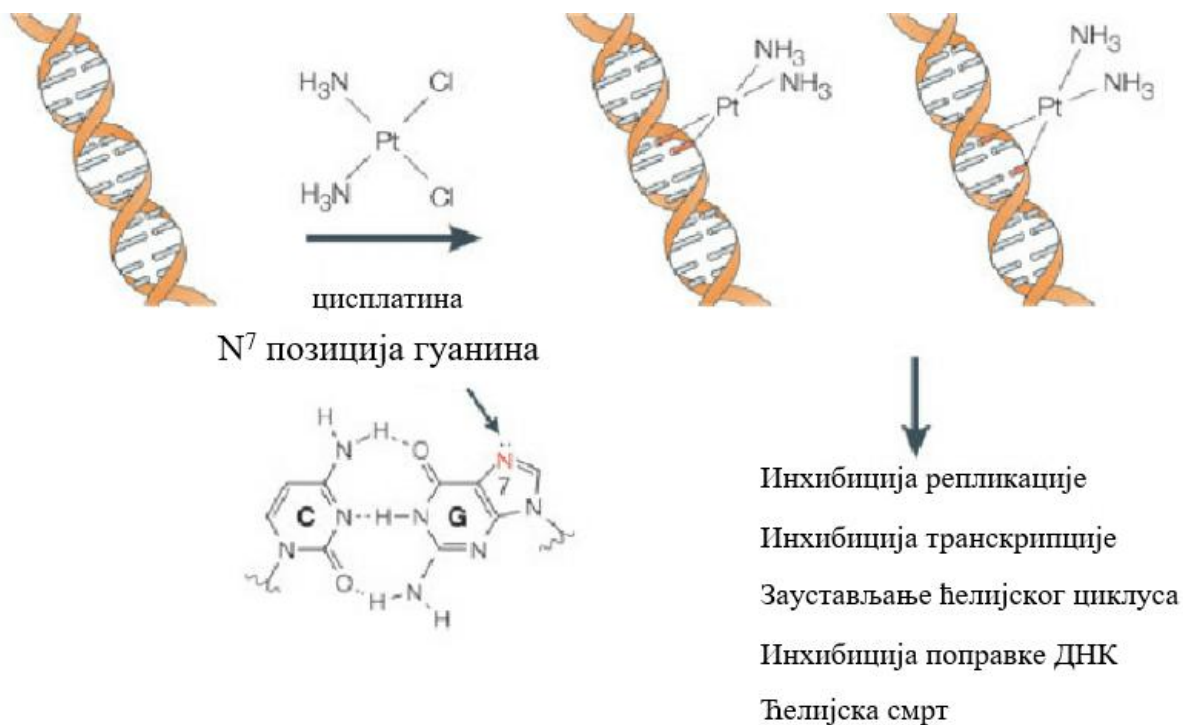
1.4.1. Комплекси платине прве генерације

Иако је синтетисана у другој половини 19. века антитуморски ефекат цисплатине је доказан тек крајем 20. Века (87). Ово је доказано тако што је проучавана *Escherichia coli* заправо њена деоба под утицајем платине, сунчеве светлости и амонијум хлорида. Очекивано изпрва се није знао тачан механизам заустављања деобе. Овај ефекат се приписивао простом електричном пољу. Тек касније је доказано да заправо у овом електричном пољу дошло до електролизе и случајног формирања комплекса платине који добија назив цисплатина и има хемијску формулу (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]. Овај комплекс *Rosenberg* и сарадници (88, 89) шездесетих година прошлог века користе и доказују да има цитотоксично дејство на мишији модел леукемије и саркома (*слика 10*). Њихови резултати иницирају почетак клиничких студија да би 1978. била одобрена од стране Америчке агенције за лекове и храну за употребу у лечењу карцинома бешике и тестиса (90). Данас поред ових користи се и за лечење неких облика карцинома материце, јајника, меланома, дојке, врата, главе и плућа (91, 92).



Слика 10. Хемијска структура цисплатине

Антиканцерско дејство платина остварује деловањем на нивоу цитоплазме и једра. 21. У хемијском смислу цисплатина се састоји из два пара лигананда који су један пар лабаво везан (хлоридни) и чврсто везани (амино). Кључна тачка у деловању је замена ових „лабавих“ хлоридних лигананда водом (93). У крви када је концентрација хлора велика нема промене структуре, међутим у цитоплазми ћелије, у коју доспе или дифузијом било преко 1. типа транспортера бакра, стварају услови за хидролизу платине и наградњу катјонских комплекса платине(II) са два или једним молекулом воде (94). У даљем току овако настали комплекси делују тако што изазивају оксидативни стрес преко метионина, глутатиона и других протеина (95). Резултат оксидативног стреса је оштећење молекула ДНК. Аналогно овој причи одбрамбени механизми ће инактивисати цисплатину тако што ће деловати преко антиоксидативног система (96). Позиција 7 на имидазолном прстену гуанина и аденозина је мета за коју се ковалентно везује новосинтетисан комплекс платине са једним или два атома воде (97, 99). Ове ковалентне везе могу бити у оквиру истог ланца ДНК али и између суседних ланаца (моно или дифункционални комплекси). Резултат ових веза је прекид транскрипције и репликације са следственом смрти ћелије (слика 11).

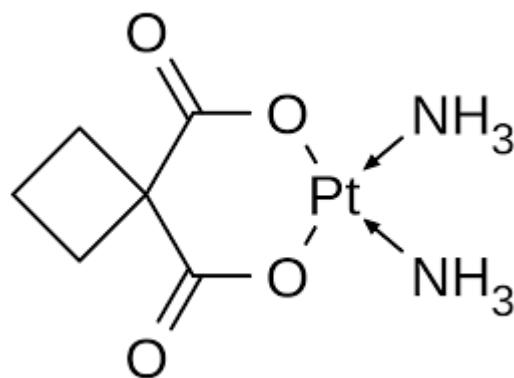


Слика 11. Схематски приказ механизма дејства цисплатине (модификовано са сајта: https://www.researchgate.net/figure/The-platinum-atom-of-cisplatin-binds-covalently-to-the-N7-position-of-purines-to-form_fig2_221920821)

Као и код већине лекова ефекат цисплатине је дозно зависан. Међутим са повећањем дозе повећава се токсичност лека (нефро, хепато, ото, ембриотоксичност, тромбоцитопенија, периферна неуропатија исл.) као резултат њеног неселективног дејства. Занимљив је податак да само 5-10% дозе реагује са ДНК. Остатак ступа у интеракцију са молекулама тио групе аминокиселина са метионином и цистеином (садрже сумпор) (100). Типичан пример оваквих протеина је албумин из крвне плазме. Осим албумина може се везивати и за фосфатидил серин или фосолипиде ћелијске мемране а када доспе у цитоплазму након хидролизе везаће се за оне хемијске врсте који имају слободне *N* и *S* атоме што су јон карбоната, глутатион, металотионеиним или фосфати (101).

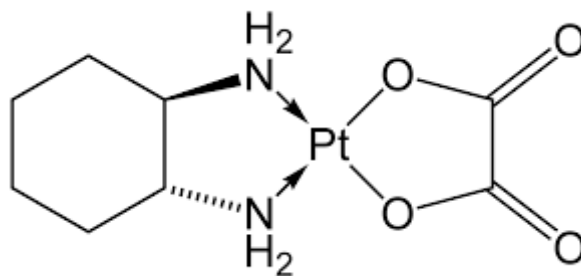
1.4.2. Комплекси платине друге и треће генерације

Осим кључног недостатка цисплатине које се односи на неспецифичност и следствену цитотоксичност временом након поновљених доза долазило је до појаве резистенције (75). У циљу да се повећа ефикасност а смањи токсичност цисплатине последњих деценија се радило на синтези комплекса платине друге и треће генерације (101). Најважнији синтетисани који се данас користе су Карбоплатина (од 1989 године) (слика 12), Оксалплатина (у употреби од 2002. године) успешно коришћени у већини земаља широм света а употреба Недаплатине је дозвољена само у Јапану. (102-105)



Слика 12. Хемијска структура карбоплатине

За разлику од деривата прве генерације Карбоплатина уместо лабавих лиганата који садрже хлор групе има лиганд са бидентатном структуром (турандикарбоксилатни). Овај комплекс има мање споредних реакција и мање је токсичан посебно у смислу нефротоксичности. (101) Индикација за примену су као и код цисплатине. Мучнина повраћање и депресија касне сржи су главне нуспојаве Карбоплатине. За разлику од Карбоплатине индикационо подручје оксалплатине је другачије у поређењу са цисплатином



Слика 13. Хемијска структура оксалиплатине

Заменом аминског лиганда диаминоциклохексанским добијена је структура новог молекула, оксалплатина (*слика 13*). Место за своју примену је нашла код туморских ћелија које су резистентне на дејство Цисплатине (102, 103). Индикационо подручје је карцином дебелог црева, може се примењивати и пер ос. Главна нежељена дејстава су далеко мања од Цисплатине али их има (ототоксичност, замор, неутропенија, неуропатија). Даљим истраживањима 1995 године је синтетисана Недаплатина која има индикационо подручје на карцином једњака, желуца, јајника, плућаглаве и врата(106-108). Има већу ефикасност у односу на карбаплатину, растворљивија је и мање токсична на бубрежну функцију и косну срж. Тежња да се синтетишу аналози платине са мање коксичних ефеката довеле су до појаве Хептаплатине и Лобаплатине (109). У свом индикационом подручју Лобаплатина садржи метастатски карцином дојке, хроничну мијелоидну леукемију, и карцином плућа (110). Нуспојаве су јој мучнина, повраћање, тромбоцитопенија, а у ређим ситуацијама аполедија, ототоксичност, неуротоксичност и нефротоксичност. Хепталплатина је нашла место у лечењу карцинома желуца (111). Бројни аналози платине су тренутно у различитима фазама клиничких испитивања (пикоплатин, сатраплатин, трансплатин, пириплатин и др.) (112).

1.4.3. Деривати платине у терапији карцинома дојке

Развојем у првом реду превентивне медицине стопа смртности од карцинома дојке је драстично смањена (113). И даље су кључни модалитети лечења хирургија и радитерапија али важна улога у лечењу ове болести је и хемиотерапија која у многоне зависи од молекуларне класификације тумора. О поделама карцинома дојке је било говора и у уводним разматрањима. Ова молекуларна подела је на основу експресије гена. Комбиновањем експресивности гена за прогестерон, естроген, Ki-67 и HER2 направљено је 5 подгрупа (114). То су:

1. луминални тип А: +ER или +PR и негативан Ki-67 и HER2. Заступљен у 40 % свих, низак хисполошки градус и индекс пролиферације и има најбољу прогнозу.
2. луминални тип Б: + ER или +PR, уз + Ki-67 и одсуство молекула HER2. Има нешто виши хисполошки градус и индекс пролиферације и лошију прогнозу у односу на претходни
3. карцином са прекомерном експресијом HER2, - ER и -PR. Има висок хисполошки градус и индекс пролиферације, изражена ангиогенеза и метастзирање. Карактерише га и висок ниво инхибице апоптозе. 48-52
4. базалоидни је троструко негативан карцином који не експримира нити ER и PR, нити HER2. Чини 15 % свих има лошу прогнозу и у основи му је митација BRCA-1. То су тумори високог пролиферативног капацитета и немају добру циљану терапију.
5. *Normal like*: +ER и +PR и негативну експресију Ki-67 и HER2, али има лошију прогнозу (45-47).

Суштина у онколошком лечењу карцинома дојке је у комбинацији хемиотерапеутика. Најчешћа комбинација је комбинација метотрексата, циклофосамида, и 5-флуороурацила. Рецидиванти метстатски и HER2- типови имају посебне протоколе и комбинације лечења хемитерапеутицима (115). Горе наведени трећи тип карцинома дојке је индикационо подручје за деривате платине. Студије су показале да има бољи ефекат као

прва линија одбране у односу на примену као резерва након неуспеха другог хемиотерапеутика (116, 117). Цисплатина је ефикаснија у односу на друге хемиотерапеутике али проблем су бројна нежељена дејства лека (118-123). То је довело до покушаја комбиновања деривата платине са другим хемиотерапеутицима (124).

Посебно место у смислу комбиновања заузима комбинација са лековима из групе таксана. (125-128). Тако, комбинација платине са биљним алкалоидима какав је Винороблин је показала боље резултате у односу на комбинацију таксан+антрациклин (129-131). Са друге стране нису све комбинације хемиотерапеутика са цисплатином дале добре резултате. На пример комбинација са Етопозидом је напротив имала већу токсичност. Са друге стране ако се у претходној комбинацији Цисплатина замени Карбоплатином добијамо јако ефикаснију комбинацију од претходне. Због високе токсичности, а ограничене ефикасности на метастатски карцином дојке, комбинација деривата платине са антрациклинима се не препоручује. Када је реч о метастатском карциному дојке са повећаном експресијом HER2 комбинација трастузумаба и платине је охрабрујућа уколико се користи као прва терапијска мера (132-134). Интересантна је чињеница да нема значајне разлике уколико се у овој комбинацији користи Цисплатина или Карбоплатина. Охрабрујући су и резултати комбинације платине са таксанима кави су паклитаксел и доцетаксел за лечење базалоидног типа карцинома дојке. Комбинација цисплатине или карбоплатине са фосфамидом и гемцитабином показала се као ефикасна у лечењу метастатског облика базалоидног типа карцинома дојке. У току су студије које испитују утицај комбинације карбоплатине или цисплатине са цетуксимабом, бевацизумабом, олапарибом или инипарибом а резервисане су за најтеже клиничке облике метастатске болести типа 3 са мутацијама гена BRCA-1 и BRCA-2 (135-138).

2. Постављени циљеви и хипотезе у студији

А. Циљеви које смо поставили у овом истраживању су:

1. Доказивање евентуалне цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине:

а) $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ (где је 1,7-phen мостни лиганд 1,7-фенантролин) (надаље обележен као: комплекс К-1)

б) $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ (где је 4,7-phen мостни лиганд 4,7-фенантролин) (надаље обележен као: комплекс К -2) на доле наведеним туморским ћелијама:

1) MDA-MB-231 – хумана ћелијска линија карцинома дојке,

2) 4T1 – анимална ћелијска линија карцинома дојке,

3) MRC-5 – фибробласти (контролна група).

2. Испитивање релативног односа између некрозом и апоптозом изазване смрти туморских ћелија која је индукована поменутиим комплексима.

3. Евалуација утицаја комплекса платине на релативни однос проапоптотичног Вах са једне стране и антиапоптотичног Bcl-2 протеина са друге стране.

4. Испитивање утицаја комплекса платине на активирање Вах-а и каспазе-3.

5. Испитивање утицаја комплекса платине на заустављање и раст туморских ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса.

Б. У складу са познатим чињеницама и дефинисаним циљевима истраживања, постављене су следеће радне хипотезе студије:

1. Новосинтетисани комплекси платине (К-1 и К -2) имају цитотоксичнодејство на канцерске ћелије са једне стране, док је цитотоксичност на фибробластима слабија.

2. Новосинтетисани комплекси платине (К-1 и К -2) делују тако што врше индукцију апоптозе у туморским ћелијама, на тај начин што повећавају релативни однос Вах/Вс1-2, а то за последицу има премештање цитохрома с у цитоплазму из митохондрија и активирање Вах-а и каспазе-3

3. Новосинтетисани комплекси платине (К-1 и К -2) заустављају процес раста туморских ћелија у једној од фаза ћелијског циклуса.

3. Материјали студије и методологија

3.1. Врста спроведене студије

Ова студија је осмишљена по типу експерименталне студије која се изводи *in vitro* на узорцима хуманог и анималног порекла. У студији су третиране две туморске линије. Једна је хумана линија ћелија карцинома дојке MDA-MB-231(ATCC® HTB-26™). Друга ћелијска линија је анималног порекла 4T1(ATCC® CRL-2539™) ћелијска линија карцинома дојке миша. Контролна ћелијска линија је линија здравих фибробласта MRC-5.

3.2. Култивисање ћелијских линија

Као што је напред наведено овим истраживањем су обухваћене две туморске ћелијске линије MDA-MB-231 и 4T1 линије карцинома дојке. Као контролну групу је третирали смо ћелијску линију MRC-5 здравих фибробласта. Да би се култивисале ове ћелијске линије коришћен је медијум за раст који обухвата DMEM у коме концентрација глукозе износи 4500 mg/L (енг. Dulbecco's Modified Eagle's Medium– High Glucose, Sigma, Germany), њему је затим додат 10% фетални телећи серум који је топлотом инактивисан (енг. FBS, fetal bovine serum, Capricorn Scientific, Germany), затим 2 mM глутамин, 100 µg/ml стрептомицин и 100 IU пеницилин. Стерилизација горе наведеног медијума је постигнута филтрирањем кроз филтере који су нитроцелулозни садрже поре 0,22 µm и тако припремљен медијум је складиштен на температури од 4°C. Да би се омогућила култивација обезбеђена је температура од 37°C и присуство 5% CO₂.

3.3. Варијабле у истраживању

У овом истраживању смо дефинисали независне и зависне варијабле. Напред наведени динуклеарни комплекси платине K-1 $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и комплекса K-2 $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ (где је 1,7-phen мостни лиганд 1,7-фенантролин, односно 4,7-фенантролин) претстављали су независне варијабле истраживања. Мерене вредности цитотоксичности и програмиране ћелијске смрти и ћелијског циклуса су биле зависне варијабле истраживања. У нашој студији смо употребљавали различите концентрације горе наведених комплекса платине које смо растварали у диметил-сулфоксиду (енг.

DMSO, dimethyl sulfoxide) са разблажењем у медијуму уз ограничење да концентрација диметил-сулфооксида не прелази 0,5% v/v.

3.4. Синтеза динуклеарних комплекса

3.4.1. Синтеза полазног мононуклеарног $[Pt(en)Cl_2]$ комплекса

Мононуклеарни комплекс платине (II) $[Pt(en)Cl_2]$ синтетизован је у складу са поступком објављеним у литератури (139-141). Дестилована вода је деминерализована и пречишћена до отпора већег од 10 $M\Omega\ cm^{-1}$. Једињења етилендиамин (en), 1,7-фенантролин (1,7-fen), 4,7-фенатролин (4,7-fen) и $K_2[PtCl_4]$ добијена су из Sigma-Aldrich Chemical Co. Чистоћа и састав комплекса је проверена помоћу резултата елементарне микроанализе, 1H и ^{13}C NMR спектроскопије.

У 10 cm^3 воде смо растворили 0,2076 g ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mola) $K_2[PtCl_4]$ и додали еквимоларну количину диаминског лиганда - етилендиамина. Добијени раствор смо закиселили (pH = 3,0) додавањем раствора HCl концентрације 1,0 mol/dm^3 . Реакциону смешу смо затим загрејали на 80 $^{\circ}C$ у трајању од 2 сата. Комплекс кристалише из мале запремине воденог раствора на собној температури. Издвојене кристале комплекса смо потом одвојили цеђењем, испрали са мало хладне воде, а затим етанолом и сушили на ваздуху. Чисти комплекс добили смо прекристализацијом из мале количине топле воде и хлађењем.

3.4.2. Синтезе динуклеарних $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ комплекса

Комплекс $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ (где је 1,7-phen мостни лиганд 1,7-фенантролин, односно 4,7-фенантролин) су добијени полазећи од мононуклеарног комплекса $[Pt(en)Cl_2]$ по модификованом поступку који је раније описан у литератури (142, 143). Суспензији већ формираног мононуклеарног $[Pt(en)Cl_2]$ комплекса (218,8 mg, 0,671 mmol) у диметилформамиду (DMF) је додан DMF раствор $AgNO_3$ у капима 1: 0,98, моларни однос (111,7 mg, 0,656 mmol). Смеша је мешана

преко ноћи у мраку на собној температури. Након уклањања талога AgCl филтрацијом, добијени бледо жути раствор [Pt(en)Cl(dmf)]NO₃ коришћен је као полазни материјал за добијање потребних 1,7-phen и 4,7-phen- мостних комплекса платине (II).

DMF раствор 1,7- фенантролин 4,7- фенантролин лиганда (0.0605 g; 0.335 mmol) смо у капима додавали у раније синтетисан раствор [Pt(en)Cl(dmf)]NO₃ комплекса у моларном односу 2:1 molar ratio (комплекс : мостни лиганд). Добијену смешу смо мешали на собној температури у мраку током 24 часа. Растварач је потом испарен ротацијом, а остатак испран етром. Овако добијен сирови производ је растворен у минималној количини воденог раствора LiClO₄ (0.5 M). Добијени раствори су остављени преко ноћи у мраку. Бледо жути талог је садржао два комплекса [{Pt(en)Cl}₂(μ-1,7-phen)](ClO₄)₂ и [{Pt(en)Cl}₂(μ-1,4-phen)](ClO₄)₂. Након што је талог укоњен филтрацијом и испран етром а након тога осушен на ваздуху добили смо принос између 40% и 50%. Анализа комплекса K1 је дала следеће резултате: (C₁₆H₂₆N₆Cl₄O₉Pt₂, FW = 978.38): C, 19.64; H, 2.68; N, 8.59; Пронађено: C, 19.87; H, 2.74; N, 8.72%. ¹H NMR (200 MHz, CD₃COCD₃): δ = 7.91 (m, 2H, C3H/C9H), 8.45 и 8.61 (dd, d, 2H, C5H/C6H), 9.18 и 9.53 (2d, 2H, C4H/C10H), 9.68 и 9.86 (2d, 2H, C2H/C8H) и 3.04 (m, 8H, en) ppm. IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~ 3426 (O-H растезање); 3087 (N-H растезање); 1625, 1598 (C=N/C=C 1,7-phen растезање); 1146, 1113, 1089, 626 (перхлоратни бројач). UV-vis (dmf/H₂O (1:9, v/v), λ_{max}, nm): 277.0 (ε = 18.6·10³ M⁻¹cm⁻¹). Анализа комплекса K2 је дала следеће резултате: (C₁₆H₂₆N₆Cl₄O₉Pt₂, FW = 978.38): C, 19.64; H, 2.68; N, 8.59; Пронађено: C, 19,52; H, 2.78; N, 8,43%. ¹H NMR (200 MHz, CD₃COCD₃): δ = 8.03 (m, 4H, C2H/C9H и C5H/C6H), 9.65 (m, 2H, C1H/C10H), 10.12 (m, 2H, C3H/C8H), и 3.03 (m, 8H, en) ppm. IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~ 3414 (O-H растезање); 3070 (N-H растезање); 1623, 1585 (C=N/C=C 4,7-phen растезање); 1108, 1090, 627 (перхлоратни бројач). UV-vis (dmf/H₂O (1:9, v/v), λ_{max}, nm): 280.0 (ε = 18.5·10³ M⁻¹cm⁻¹).

3.4.3. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа за C, H и N параметре је извршена на Микроаналитичком одељењу Института за хемију Хемијског факултета, Универзитета у

Београду. Сва мерења су рађена на собној температури. Апарат за рН мерења (S220 SevenCompact, рН/Ion, Mettler Toledo) је калибрисан пуферским раствором рН 4.00 и 7.00. Анализа ће бити спроведена на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer у CHS моду.

3.4.4. Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра биће спроведено на Институту за хемију Природно-Математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. УВ-вис спектри снимљени су на Shimadzu -овом спектрофотометру са двоструким оптом опремљеним термостатским кварцним Suprasil ćелијама од 1,00 cm, након растварања одговарајућих динуклеарних комплекса платине (II) у dmf / H₂O (1: 9, v / v) води, при таласној дужини од 200–600 nm. Концентрација динуклеарних комплекса платине(II) iznosila je 5–10⁻⁵ M.

3.4.5. Нуклеарно-магнетно-резонанционa спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра (¹H и ¹³C NMR) комплекса је спроведено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу Varian Gemini-2000 NMR спектрофотометра 2000 (1H на 200 MHz) користећи 5 mm NMR цеви, на 25 ° C. За снимање ¹H и ¹³C NMR спектра употребљени су D₂O и CD₃COCD₃ (DMSO-*d*₆) као растварачи и TSP (натријум-3-(триметилсиллил)-пропионат-2,2,3,3-*d*₄) као референтни стандард.

3.4.6. Припрема раствора лека

Комплекси платине (II), K1 и K2, цисплатине (CDDP) и оксалиплатине (L-OHP) су прво мерени, растворени у диметил сулфоксиду (DMSO, Fisher Scientific, UK) у концентрацији од 40 mM и филтрирани кроз филтере са пречник пора 0,22 mm. Затим су једињења разблажена у комплетном медијуму тако да крајња концентрација диметил сулф оксида никада није била већа од 0,5% (v / v). Серије за разређивање направљене су у растућим концентрацијама од 0,1 μM до 100 μM (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100μM). Сви раствори коришћени у експериментима су припремљена искључиво на дан експеримента, како би

се избегла промена хемијске структуре испитиваних једињења. Контролна популација нетретираних ћелија култивисана је истом концентрацијом диметил сулфооксида као у ћелијама третираним са максималном концентрацијом испитиваних супстанци. Празнине су биле јамице које нису садржавале ћелије или медијуме.

Након третмана ћелијских линија, помоћу МТТ теста, је одређивали смо способност преживљавања ћелија 24, 48 и 72 часа након излагања ћелија горе наведеним комплексима платине у серијама концентрација од 0,3 μ М до 100 μ М (0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μ М) у односу на способност преживљавања нетретираних ћелија (144, 145). Супстанца са раније доказаним цитотокичним ефектом као позитивна контрола коришћена је цисплатина.

Ћелије обојене Annexin-ом V и пропидијум-јодидом смо испитивали на проточном цитометру и на тај начин смо одређивали који тип смрти ћелије изазивају комплекси платине али и релативни однос ћелијске смрти некроза/апоптоза (145). Такође проточном цитометријом смо испитивали механизме индукције апоптозе коју врше комплекси платине након што смо обележили третиране ћелије специфичним антителима протеина апоптозе и то: Вах (проапоптотски), Bcl-2 (антиапоптотски), цитохром c и активна каспаза-3. Након добијених резултата смо израчунали индекс (релативни) нивоа експресије проапоптотски/антиапоптотски за протеине апоптозе. Одређивали смо релативни однос експресије проапоптотичног протеина Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина. Даље, поредили смо третиране и нетретиране ћелије у смислу удела броја ћелија код којих је дошло до преласка цитохрома c из митохондрије са следсвеном активацијом каспазе-3 и Вах-а.

3.5. Тест ћелијске пролиферације (МТТ)

МТТ (Sigma, Немачка) тест у нашем истраживању служи за квантитативно испитивање пролиферације или способности преживљавања ћелија након третмана комплексима платине (144, 145).

Тест се заснива на следећем принципу:

Жива ћелија која је активна метаболички уз помоћ ензима дехидрогензе митохондрија има способност да процесом редукције соли тетразолијум бромида, МТТ (3-(4,5-

диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид) који је жуте боје преведе у формаган љубичасте боје. Поменути формаган се налази унутар живе ћелије и може се растворити и измерити спектрофотометром. Овај тест нам дакле служи са једне стране за мерење степена умножавања ћелија а са друге стране уколико ћелије иду у правцу апоптозе или некрозе он нам омогућава праћење смањења способности преживљавања ћелија. За квантификацију резултата смо користили ELISA читач (Zenyth 3100, AnthosLabtec Instruments) који је подешен да мери интензитет љубичасте боје на таласној дужини од 595 nm. Способност ћелија да преживе након третмана комплексима смо испитивали у три независна експеримента и то у трипликату. За култивацију смо користили плоче са 96 бунара. Користили смо серију растућих разблажења комплекса платине као што је раније наведено од 0,3μM до 100 μM (0,3; 1; 3; 10; 30; 100μM). Новосинтетисани комплекси K1 и K2 су растворени у вискомим концентрацијама DMSO-а које су и до 400 пута више од највише у серији разблажења комплекса платине. Раније смо навели да коначна концентрација DMSO-а у медијуму за култивацију не прелази 0,5% v/v. Након што смо ћелије инкубирали у плочама са бунарима запремине 200 μl и просечног броја ћелија по сваком бунару 5×10^4 мерили смо способност ћелија да преживи 24, 48 односно 72 сата након инкубације K1 и K2 комплексима. У сваки бунар смо ставили по 100 μl суспензије која садржи просечно 5×10^4 ћелија. МТТ раствор у разблажењу 1:10 са фосфатним пуфером PBS-а (Phosphate Buffer Saline) се додавао у сваки бунар и третираних и нетретираних ћелијских суспензија. Потом следи инкубација од 4 сата на 37°C са 5% CO₂. У даљем току експеримента одлије се супернатант и у бунарчиће улије се 150 μl DMSO-а. Следећи корак је механичко мешање са раствором DMSO у трајању од око 30 минута, након чега следи мерење апсорбанце љубичасте боје на таласној дужини од 595 nm. Анализом апсорбанце код третираних и поређењем са апсорбанцом нетретираних бунара на индиректан начин је израчуната повећана, односно смањена способност ћелија да преживи (вијабилност). Ова вредност је израчуната формулом:

$$\% \text{ живих ћелија} = (E - B) / (K - B) \times 100$$

E - ћелије третиране испитиваном супстанцом (апсорбанца);

B - контрола-бленк (апсорбанца);

К - нетретиране ћелије (апсорбанца)

3.6. Квантитативно испитивање апоптотске смрти Annexin V- PI тестом апоптотичности

Као што је у уводном разматрању наведено апоптоза је тип такозване програмиране ћелијске смрти у чијој основи је транслокација фосфатидил-серина са спољашње на унутрашњу страну ћелијске мембране. Ова појава за последицу има асиметрију још увек очуване ћелијске мембране узроковану променама фосфолипида мембране. Кључни фактор у овом тесту је Annexin V, протеин са израженом способности формирања веза за везивања за фосфатидил-серин, калцијум али и фосфолипиде (145, 146). Са друге стране фазу касне апоптозе и некрозу карактерише губитак интегритета ћелијске мембране а ова појава омогућава појединим молекулима да се вежу за ДНК у ћелији. Једна од ових супстанци је пропидијум јодид (PI енгл. propidium iodide). Анализом резултата на проточном цитометру софтвером СХР Cytometer, FlowJo и Flowing software v2.5 дошли смо до 4 типа резултата. Прво, Annexin V (-); PI (-) ћелије су живе ћелије, Annexin V (+); PI (-) ћелије су у фази ране апоптозе, Annexin V (+); PI (+) су у фази касне апоптозе а Annexin V (-); PI (+) су ћелије које су умирале некрозом. Ћелијску суспензију за анализу смо припремили на следећи начин: ћелијске културе смо тертирала комплексима платине K1 и K2 у трајању од 24 часа. Након инкубације коришћен је PBS за испирање а потом пуфер за ледено хладно везивање за прављење суспензије концентрације ћелија $1 \times 10^6/\text{ml}$. Надаље следи у 100 μl формиране суспензије додавање 10 μl Annexin V и 20 μl PI. Након инкубације у мраку на 4°C у трајању од 15 минута радили смо ресуспензију у 400 μl везујућег пуфера а након тога је садржај анализиран на проточном цитометру.

3.7. Анализа фаза ћелијског циклуса

Да би анализирали ћелијски циклус, потребна нам је супстанца која је селективна у смислу везивања за молекул ДНК. Једна од таквих супстанци је и пропидијум-јодид (PI) (145, 147). Суштина дакле овог теста је да на основу количине ДНК (диплоидна/хаплоидна количина) индиректно закључимо у којој фази ћелијског циклуса се исти зауставља тј. у којој фази је највећи број ћелија након третмана. Након што се веже за молекул ДНК на основу интензитета флуоресценције одредили смо молекула ДНК у туморским ћелијама

које се налазе у одређеној фази ћелијског циклуса. Ћелијске линије 4T1 и MDA-MB-231 смо третирали новосинтетисаним комплексима K1 и K2, цисплатином у концентрацији од IC₅₀. Након инкубације од 24 часа на 37°C 5% CO₂ у апсолутно влажној средини, ћелије смо испрали PBS-ом а потом их хладним етанолом (70%) фиксирали на 4°C. Да бисмо умањили присуство РНК која би пореметила резултат услед неселтивности PI ресуспендовали смо ћелије у 1ml PBS-а са ензимом RNA-а А (500 µg/ml, Sigma, Немачка) 30 минута на температури 37°C. На овај начин припремљене ћелије смо обојили са 5 µl раствора (10mg PI/mlPBS-а). Након инкубације у мраку на 4°C у трајању од 15 минута суспензију смо анализирали проточним цитометром (интензитет флуоресценције), Cytomics FC500 (Beckman Coulter), а резултати су приказани на хистограму.

3. 8. Анализа протеина апоптозе (Вах, Bcl-2, и активне каспазе-3)

У овом делу нашег истраживања смо имали за циљ да испитамо ниво експресије протеина апоптозе и то оних проапоптотских Вах, антиапоптотских Bcl-2 и ензима каспазе-3. Испитивали смо како IC₅₀ концентрације K1 и K2 комплекса и цисплатине након тертмана од 24 часа ћелијских линија делују на експресију протеина апоптозе (145, 148-150). По тертману ћелија следи пропирање леденим PBS-ом након чега следи ресуспензија до концентрације од 2x10⁶ ћелија/ml, фиксација и ресуспензија. Раствор са 20µl козјег серума, 0,2 М глицина и 30µl PBS-а се користи за инкубацију од 20 минута. Након тога следи испирање са 4 ml PBS-а у центрифуги на 400xg у три наврата у трајању од по 5 минута. Овако припремљене ћелије смо подвргнули бојењу специфичним антителима. Антитело које везује Bcl-2 је по типу примарно јер је већ обојено. У разблажењу од 1:800 је инкубирано на собној емператури 15 минута. Друга два испитивана протеина апоптозе смо најпре инкубирали са адекватним примарним антителима у трајању од 30 минута на собној температури. Следећи корак је употреба секундарних антитела за Вах и активну каспазу-3 у мраку на собној температури 30 минута. Последњи корак овог експеримента је испирање ћелија и ресуспензија у PBS-у као припрема за анализу проточном цитометријом.

3.8.1. Проточна цитометрија протеина апоптозе

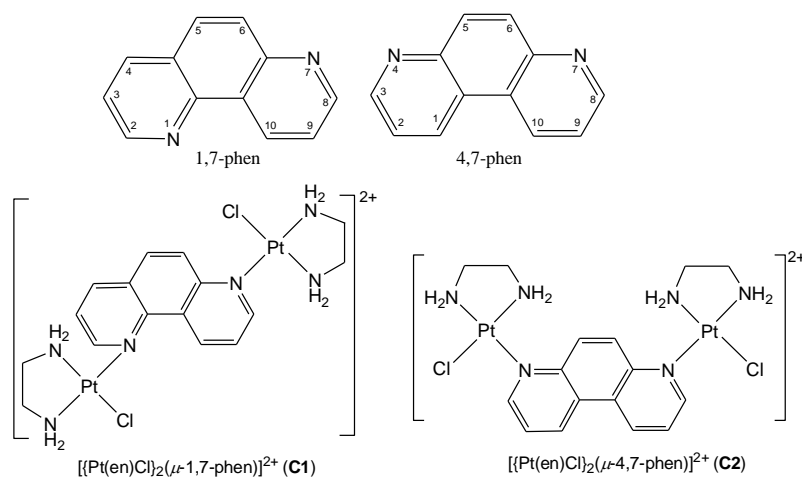
У овој фази експеримента је ресупензија ћелија анализирана на проточном цитометру (The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter) који има могућност да мери 20000 догађаја. 4T1 и MDA-MB-231 ћелијске линије су подвргнуте мерењу интензитета флуоресценције. Овај интензитет је стандардизован обзиром да је у испитивању коришћено и антитело за тзв. негативну изотипску контролу. Податке од значаја за наше истраживање смо приказали вредностима просечног интензитета флуоресценције (MFI, meanfluorescence intensity). Вредности овог интензитета за Bcl-2 и Bax смо добили односом интензитета у односу на контролу (145). Са друге стране ниво експресије активираних каспазе-3 смо приказали као проценат ћелија са ефектом флуоресценције.

4. Резултати истраживања

4.1. Синтеза и карактеризација динулеарник комплекса платине K1 и K2

4.1.1. Синтеза и структурна карактеризација динуклеарних $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ комплекса

Полазна тачка за синтезу комплекса $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ у даљем тексту K1 и K2 су мононуклеарни $[Pt(en)Cl](dmf)NO_3$ који су се повезујући са лигандима 1,7-фенантролин, односно 4,7-фенантролин за премошћавање организовали у динуклеарне комплексе (Слика 14)



Слика 14. Структурна формула мостних лиганда 1,7-phen и 4,7-phen ligands и одговарајућих динуклеарних комплекса платине (II) комплекс C1 и C2. Атоми угљеника су обележени према IUPAC правилима.

4.1.2. Елементална микроанализа

Након синтезе ова два комплекса урадили смо елементалну С, Н и N атоме. На основу добијених података може се закључити одлично слагање између израчунатих и нађених вредности за испитиване комплексе платине. Анализом резултата K1 комплекса уочавамо слагање у израчунатим и измереним вредностима процената заступљености појединих антома. (Табела 2).

K1 C ₁₆ H ₂₆ N ₆ Cl ₄ O ₉ Pt ₂ , FW = 978.38	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	19.64	2.68	8.59
Нађено	19.87	2.74	8.72

Табела 2: Резултати елементарне микроанализе [$\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,7\text{-phen})$] комплекса

Анализом резултата K2 комплекса такође уочавамо слагање у израчунатим и измереним вредностима процената заступљености појединих антома. (Табела 3)

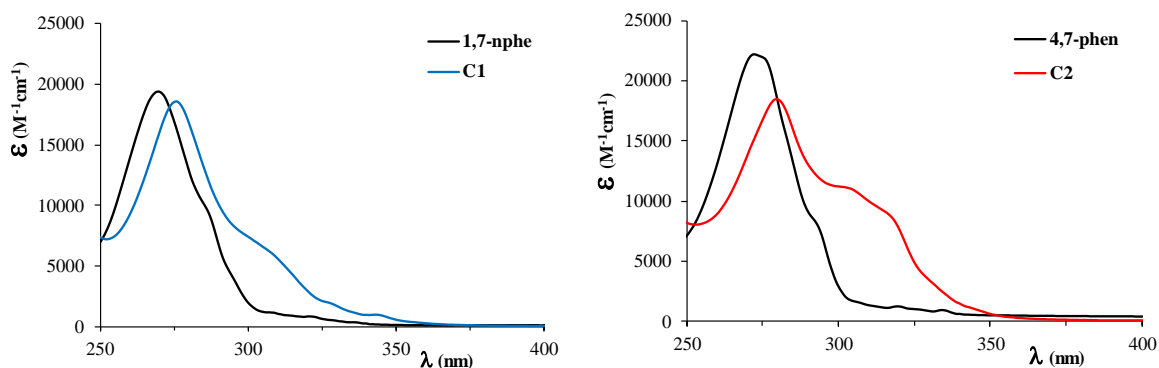
K2 C ₁₆ H ₂₆ N ₆ Cl ₄ O ₉ Pt ₂ , FW = 978.38	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	19.64	2.68	8.59
Нађено	19.52	2.78	8.43

Табела 3: Резултати елементарне микроанализе [$\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}4,7\text{-phen})$] комплекса

4.1.3. Инфрацрвена спектроскопија

Спектрофотометрија са UV-висом од C1-C3 у dmf / H₂O (1: 9, v / v) у концентрацији од 5×10^{-5} M приказана је на *слици 15*. Таласне дужине максималне апсорпције за ове комплексе (λ_{max} , nm) и моларни коефицијенти изумирања (ϵ , M⁻¹cm⁻¹), одређени су одмах

по растварању комплекса И њихове измерене вредности за К1 комплекс су: 277.0 nm ($\epsilon = 18.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) а за комплекс К2 износи 280.0 nm ($\epsilon = 18.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Врхови апсорпције за ове комплексе показују значајне црвене помаке у поређењу с онима за некоординиране N-хетероцикличне ($\lambda_{\text{max}} = 277$ и 280 nm за C1 и C2), што указује да апсорпција која је опажена за комплексе може бити приписана LMCT (ligand-to-metal charge transfer) променама(151)



Слика 15. UV–vis спектри комплекса C1 C2 мерених на $5 \cdot 10^{-5}$ M dmf/H₂O (1:9, v/v) раствору

Инфрацрвена спектроскопија: ИР спектри комплекса К1 и К2 снимљени у опсегу $4000\text{--}4500 \text{ cm}^{-1}$ показују појасеве који се приписују координираним N-хетероциклима. Широки опсег апсорпције на ~ 3426 када је реч о К1 комплексу $\sim 3414 \text{ cm}^{-1}$ код К2 комплекса, додељен је вибрацијама растезања ОН групе и потврђује присуство координираних и кристалних молекула воде у К1 и К2 [16]. Поред тога, ови комплекси показују две врло јаке и оштре појасеве ~ 3087 код К1 комплекса до 3070 cm^{-1} код К2 комплекса, који су додељени асиметричним и симетричним вибрацијама истезања, координиране амино групе двоетандованог координираног етилендиаминог лиганда (N-H растезање) (152). Добијени подаци спектроскопије на мостним лигандима су следећи; $1625 \text{ K1- } 1625 \text{ K2}$ (C=N растезање); $1598 \text{ K1- } 1585 \text{ K2}$ (C=C растезање). Увиђамо да постоји мала разлика између апсорпције 1,7-phen и 4,7-phen лиганда која се може приписати растезарима узмеђу угљеникових атома.

Комплекси K1 и K2 показују веома јак појас у распону од 1146 – 1089 cm^{-1} и јак на 626 и 627 cm^{-1} , који се могу приписати режимима $\nu(\text{ClO})$ and $\delta(\text{OClO})$, некоординирани перхлорати (153). Присуство две траке које се приписују асиметричној вибрацији истезања ClO_4^- јона може бити последица његовог учешћа у интеракцијама везања водоника, што резултира смањењем симетрије тачке групе са Td to $C2$, што доводи до спектроскопског „псевдомонодентата“ понашање ClO_4^- јона [18,19]. Анализом резултата за K1 комплекс добијамо вредности: 1146, 1113, 1089, 626 (перхлоратни бојач) а за K2 комплекс 1108, 1090, 627 (перхлоратни бојач).

4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Комплекси су карактерисани помоћу ^1H NMR спектроскопије. У ароматичном региону, ^1H NMR спектар K1 комплекса се састоји од четири карактеристичне групе сигнала за које је одговорно осам протона три кондензована ароматична прстена у N-хетероциклу, са резонанцијама помереним према доле у односу на протоне некоординисаног 1,7-*feni* лиганда. Ово померање је уочено на свим протонима анализираним на појединим атомским позицијама. Запажено померање ароматичних протона у N-хетероцикличком лиганду након њихове платинације може се приписати делокализацији недостатка набоја (формирање катјон-а платине (II) координацијом) кроз све прстенове у молекули, како се предвиђало (154, 155). Узимајући у обзир све ароматске протоне, значајне вредности координационих помака $\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}}$ су +0.18 и +0.72 ppm за K1 комплекс (*Табела 4*).

Atom position	C1H	C2H	C3H	C4H	C5H/C6H	C8H	C9H	C10H
1,7-phen	–	9.07, dd 9.55, dd	7.73, m	8.46, dd 9.04, dd	8.08, q	9.07, dd 9.55, dd	7.73, m	8.46, dd 9.04, dd
C1	–	9.68, dd; 9.86, dd (+0.61; +0.31)	7.91, m (+0.18)	9.18, d; 9.53, d (+0.72; +0.49)	8.45, d; 8.61, dd (+0.37; +0.53)	9.68, dd; 9.86, dd (+0.61; +0.31)	7.91, m (+0.18)	9.18, d; 9.53, d (+0.72; +0.49)

Табела 4: ^1H NMR хемијске и координатне промене (δ , ppm), у више тачака за слободни 1,7-phen и у склопу одговарајућег комплекса платине(II) (C1) у CD_3COCD_3 као растварачу.

^1H NMR спектар K2 комплекса састоји се од три карактеристичне групе сигнала које одговарају осам протона 4,7-fen лиганда. Сигнали слободног лиганда у ^1H NMR спектрима на 7,75 ppm што одговара C2H / C9H сигнал од 8,21 ppm за C5H / C6H. У спектрима K2 дају мултиплет на 8,03 ppm. Као што се може видети у Табели 1, резонанције за све ароматске протоне у K2 се померају у односу на оне за некоординисани 4,7-fen ligand ($\Delta(^1\text{H})_{\text{coord}} = +0.18 - +0.89$), што се може објаснити као и код K1 комплекса (*табела 5*).

Atom position	C1H	C2H	C3H	C4H	C5H/C6H	C8H	C9H	C10H
4,7-phen	9.03, dd	7.75, dd	9.23, dd	–	8.21, s	9.23, dd	7.75, dd	9.03, dd
C2	9.65, m (+0.62)	8.03, m (+0.28)	10.12, m (+0.89)	–	8.03, m (+0.18)	10.12, m (+0.89)	8.03, m (+0.28)	9.65, m (+0.62)

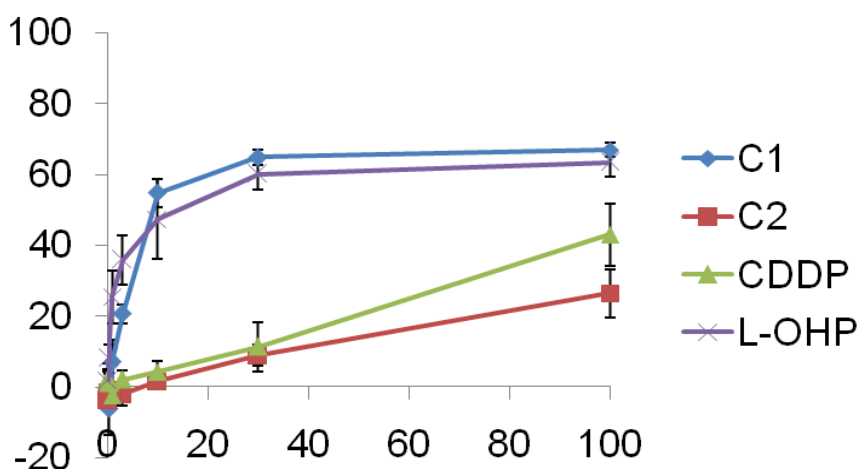
Табела 5: ^1H NMR хемијске и координатне промене (δ , ppm), у више тачака за слободни 4,7-phen и у склопу одговарајућег комплекса платине(II) (C2) у CD_3COCD_3 као растварачу.

4.2. Испитивање цитотоксичности комплекса.

4.2.1. Цитотоксичност комплекса платине K1, K2, цисплатине и оксалплатине на ћелијске линије карцинома дојке хуманог порекла (MDA-MB-231)

У циљу испитивања ефикасности горе наведених новосинтетисаних комплекса платине мерили смо цитотоксичност K1 и K2 комплекса различитих концентрација од 0,1 μM до 100 μM (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 μM) на две туморске културе ћелија, хумана (MDA-MB-231) и мишја (4T1). Контролна група здравих ћелија коју смо такође третирали комплексима је култура здравих фибробласта (MRC-5). За поређење ефикасности напред наведених комплекса користили смо тест цитотоксичности цисплатине и оксалплатине на истим овим ћелијским линијама. Резултати нашег истраживања показали да је цитотоксичност комплекса које смо синтетисали али и контрола цисплатине и оксалплатине дозно зависна. Са повећањем концентрације лека, односно комплекса, повећава се проценат цитотоксичности. Након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 24 часа комплексом K1 резултати показују да при нижим концентрацијама 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM заправо и нема цитотоксичности. При концентрацији од 3 μM значајно смањује број вијабилних ћелија за $20.7\pm 2.7\%$. Са порастом концентрације расте и ефикасност у смислу цитотоксичности, па тако у концентрацији од 10 μM износи $54.7\pm 3.99\%$, при концентрацији од 30 μM износи $64.87\pm 2.07\%$ а у највишој концентрацији од 100 μM износи $66.98\pm 2.01\%$. Са друге стране након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 24 часа комплексом K2 резултати показују да такође у нижим испитиваним концентрацијама нема цитотоксичног ефекта. Чак при концентрацији од 30 μM цитотоксичност износи само $8.90\pm 2.89\%$, што је знатно мањи резултат у односу на K1 комплекс. У највишој концентрацији од 100 μM $26.47\pm 6.78\%$. Инкубацијом цисплатине са ћелијама културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 24 часа и анализом теста цитотоксичности налазимо да је цисплатина слична K2 комплексу од 0.1-10 μM су вредности цитотоксичности једноцифрене а при концентрацији од 30 μM износи $11.30\pm 6.87\%$. У највишој вредности концентрације од 100 μM износи $43.02\pm 8.87\%$ што је чини ефикаснијом од комплекса K2 али далеко неефикаснијом у односу на K1 комплекс. Оксалплатина када се инкубира 24

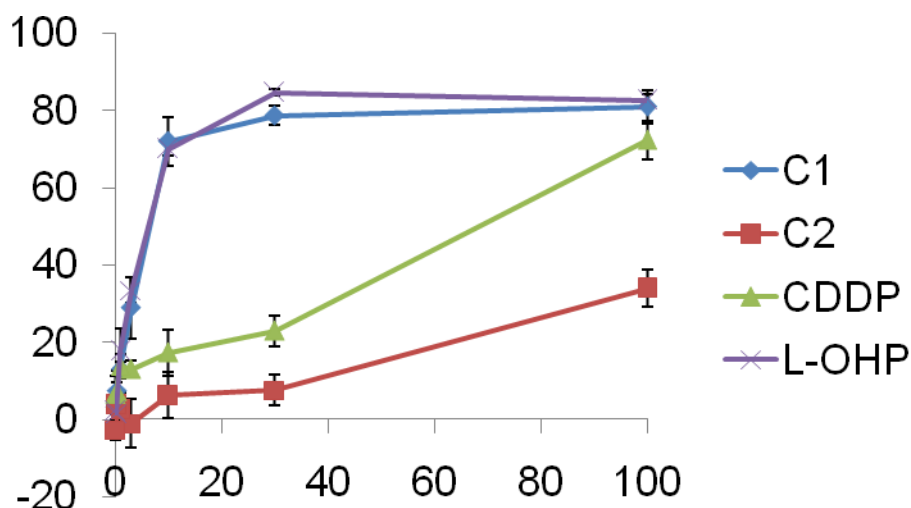
часа са ћелијама културе карцинома дојке (MDA-MB-231) већ при нижим концентрацијама даје добре резултате. До концентрације 0.3 μM је једноцифрена. У оквирима концентрације од 1 μM бележимо измерену цитотоксичност од $25.41 \pm 7.55\%$. Дозно зависно смањује вијабилност ћелија при концентрацији од 3 μM за $35.85 \pm 6.96\%$, при концентрацији од 10 μM $47.39 \pm 11.18\%$. У високим концентрацијама се приближава степену цитотоксичности К1 комплекса и за 30 μM износи $60.09 \pm 4.45\%$ а на концентрацији од 100 μM $63.43 \pm 3.90\%$ (*Графикон 1*).



Графикон 1. Цитотоксичности комплекса К1 и К2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231) након инкубације од 24 часа

У нашем истраживању смо закључили да је ефикасност гледана кроз цитотоксичност комплекса К1 и К2, цисплатине и оксалплатине осим дозне зависности показује и временску зависност. Па тако након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 48 часова комплексом К1 резултати показују да је смањење вијабилних ћелија при концентрацијама од 0.1 и 0.3 μM једноцифрено. Након 48 часова третмана у концентрацији од 1 μM добијамо резултат цитотоксичности од $13.22 \pm 1.57\%$. У концентрацији од 3 μM је цитотоксичан $28.88 \pm 7.90\%$, при концентрацији од 10 μM $72.11 \pm 6.26\%$ и надаље преко 78, $76\% \pm 2.45$ до максималне концентрације од 100 μM када убија $80.95 \pm 4.41\%$ ћелија. К2 комплекс је и након 48 часова култивације слично ефикасан

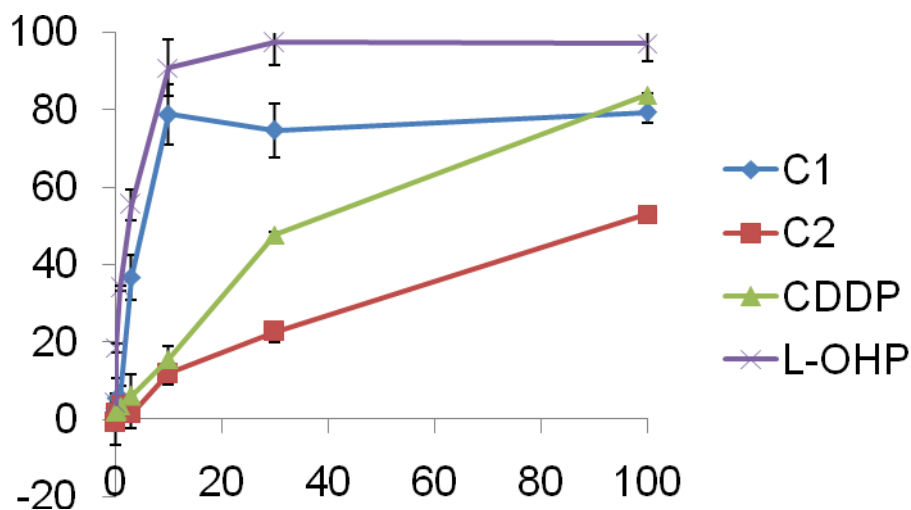
и тек у највишој концентрацији од 100 μ М је двоцифрен и износи 33.94 \pm 4.75%. Цитотоксични ефекат цисплатине је временски завистан и након 48 часова култивације до концентрације од 10 μ М је исод 20% а при концентрацији од 30 μ М износи 23 \pm 4.01%. И коначно у највећој концентрацији има цитотоксичност од 72.42 \pm 5.01%. Оксалплатина у својој ефикасности могло би се рећи да и након 48 часова култивације прати К1 комплекс и већ при концентрацији од 3 μ М износи 33.48 \pm 3.28. Када се култура карцинома дојке (MDA-MB-231) третира оксалплатином у трајању од 48 часова а при концентрацији од 10 μ М број вијабилних ћелија се смањује за 70.13 \pm 1.76%; 30 μ М 84.71 \pm 0.73 и 100 μ М 82.70 \pm 1.43% при чему нема статистички значајне разлике између К1 и оксалаплатине.(Графикон 2).



Графикон 2. Цитотоксичности комплекса К1 и К2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231) након инкубације од 48 часова

У даљем истраживању смо наставили са третманом ћелија у трајању од 72 сата. Аналогно претходним резултатима тако након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 72 часа комплексом К1 резултати показују да је значајна цитотоксичност у концентрацији од 3 μ М (36.71 \pm 5.85%) да би преко 10 μ М (78.68 \pm 7.72%) при концентрацији од 100 μ М износила 79.34 \pm 2.69%. Цитотоксичност комплекса К2

након 72 сата третмана до концентрације 30 μM ($22.59 \pm 2.69\%$) је ниска. У највишој концентрацији 100 μM износи $52.99 \pm 1.94\%$. Након 72 сата третмана цисплатином временска зависност долази до изражаја те концентрација 30 μM има цитотоксичност ($47.67 \pm 0.75\%$) а највиша концентрација $83.80 \pm 0.53\%$ али бз статистички значајне разлике у односу на К1. Ефекат оксалплатине и након 72 часа је доказан на већ ниским концентрацијама 1 μM ($33.94 \pm 0.69\%$) дозно зависно расте преко 30 μM ($97.38 \pm 5.88\%$) до коначних 100 μM ($97.18 \pm 4.75\%$) (*Графикон 3*).

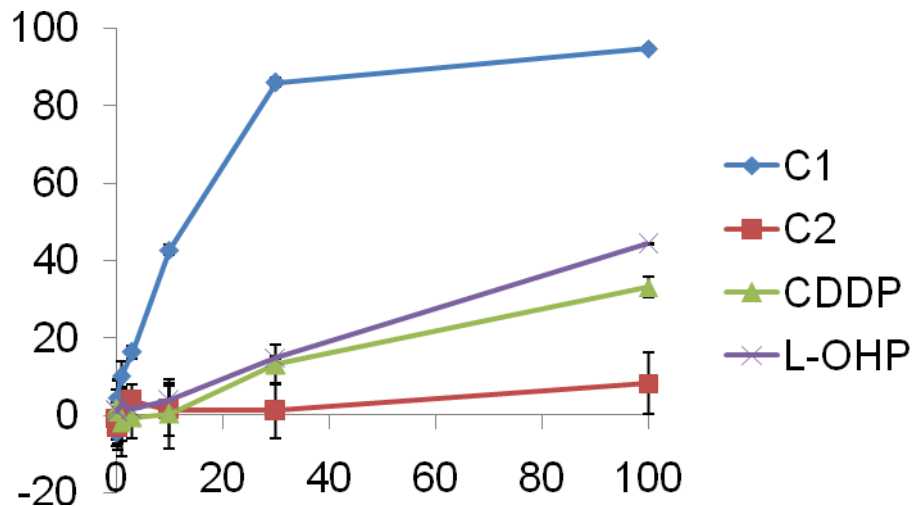


Графикон 3. Цитотоксичности комплекса К1 и К2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231) након инкубације од 72 часа

4.2.2. Цитотоксичност комплекса платине К1, К2, цисплатине и оксалплатине на ћелијске линије карцинома дојке мишјег порекла (4Т1)

У даљем току испитивања ефикасности горе наведених новосинтетисаних комплекса платине мерили смо цитотоксичност К1 и К2 комплекса, цисплатине и оксалплатине на културу ћелија карцинома миша (4Т1). Након инкубације мишје културе карцинома дојке (4Т1) од 24 часа комплексом К1 резултати показују да већ при концентрацији од 10 μM $42.71 \pm 1.29\%$ ћелија губи вијабилност. Анализом концентрације од 30 μM добили смо резултате $86.03 \pm 1.05\%$, а 100 μM убија чак $94.81 \pm 0.73\%$. Комплекс К2 на ову ћелијску линију након 24 часа слабо делује цитотоксично и практично и при највећим

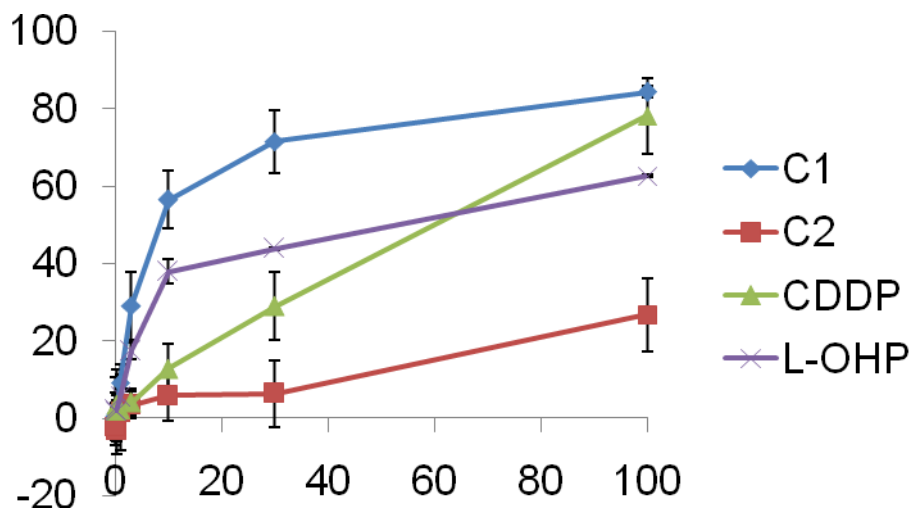
концентрацијама је једноцифрен и износи $8.23 \pm 8.01\%$. Цисплатина такође слабо делује цитотоксично на овећелије након 24 часа и практично при концентрацији од $30 \mu\text{M}$ смањује број вијабилних ћелија за $13.12 \pm 5.15\%$. Цитотоксичност оксалплатине је за статистички значајно већа у односу на цисплатину али је све до концентрација од $30 \mu\text{M}$ једноцифрен проценат смњења вијабилних ћелија у култури. У највећој концентрацији од $100 \mu\text{M}$ износи $44.30 \pm 0.18\%$ (Графикон 4).



Графикон 4. Цитотоксичности комплекса K1 и K2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) након инкубације од 24 часа

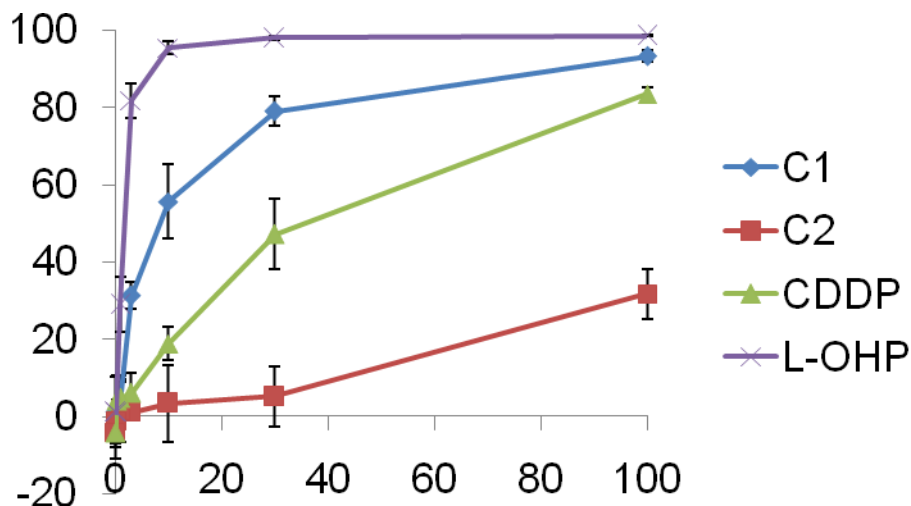
Када смо културу мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) инкубирали 48 часова комплексом K1 резултати показују да при концентрацијама од 0.1 ; 0.3 и $9 \mu\text{M}$ цитотоксичност досеже до $9.22 \pm 4.64\%$. Након тога дозно зависно се наставља раст преко $10 \mu\text{M}$ ($56.53 \pm 7.37\%$), $30 \mu\text{M}$ ($71.53 \pm 8.14\%$) и $100 \mu\text{M}$ ($84.40 \pm 1.53\%$). K2 комплекс након 48 часова има бољу цитотоксичност али тек при највишим концентрацијама од $100 \mu\text{M}$ (26.75%). Ефекат цисплатине након 48 часова долази до изражаја али при вишим концентрацијама лека $30 \mu\text{M}$ ($29.00 \pm 8.81\%$) и $100 \mu\text{M}$ ($78.22 \pm 9.78\%$). У нижим концентрацијама практично ни нема цитотоксичности. Ефекат оксалплатине у нижим концентрацијама је значајно болји у односу на цисплатину $3 \mu\text{M}$ ($17.42 \pm 2.23\%$), $10 \mu\text{M}$

($37.92 \pm 3.15\%$), $30 \mu\text{M}$ ($43.92 \pm 0.34\%$) али је у највишој концентрацији статистички значајно нижи у односу на цисплатину и износи $62.65 \pm 0.42\%$ (Графикон 5).



Графикон 5. Цитотоксичности комплекса K1 и K2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) након инкубације од 48 часова

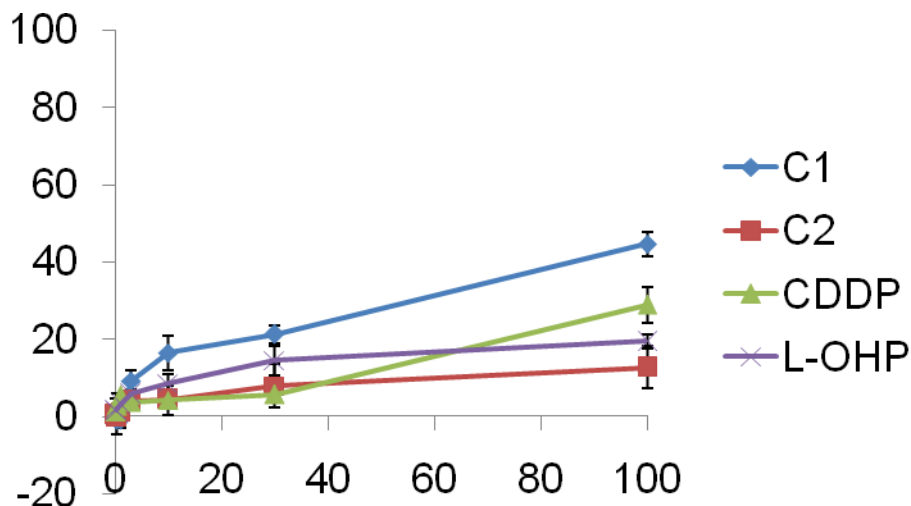
Третирањем културе мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) након инкубације од 72 часа комплексом K1 резултати показују да се проценат вијабилних ћелија смањује значајно већ са $3 \mu\text{M}$ концентрацијом ($31.24 \pm 3.52\%$) да би преко $55.67 \pm 9.67\%$ и $79.01 \pm 3.93\%$ тај проценат при највишој концентрацији од $100 \mu\text{M}$ порастао на $93.25 \pm 1.47\%$. И након 72 часа култивације K2 комплекс је тек у највишој концентрацији ефикасан и то $31.73 \pm 6.48\%$. Цисплатина задржава дозну зависност са $10 \mu\text{M}$ ($18.81 \pm 4.27\%$), $30 \mu\text{M}$ ($47.15 \pm 9.08\%$) и $100 \mu\text{M}$ ($83.51 \pm 1.73\%$). Са друге стране оксалплатина даје при ниским концентрацијама висок проценат цитотоксичности и то $1 \mu\text{M}$ ($29.00 \pm 7.15\%$), $3 \mu\text{M}$ ($81.89 \pm 4.46\%$), већ са концентрацијом $10 \mu\text{M}$ досеже до $95.53 \pm 1.62\%$, а са $30 \mu\text{M}$ $98.04 \pm 0.48\%$ односно $98.7 \pm 0.23\%$ при највишој концентрацији од $100 \mu\text{M}$. Ови резултати говоре у прилог временске зависности која је посебно изражена код оксалплатине а бољи цитотоксични ефекти K1 комплекса су регистровани већ након 24 часа примене што за остале агенсе није случај (Графикон 6).



Графикон 6. Цитотоксичности комплекса K1 и K2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) након инкубације од 72 часа

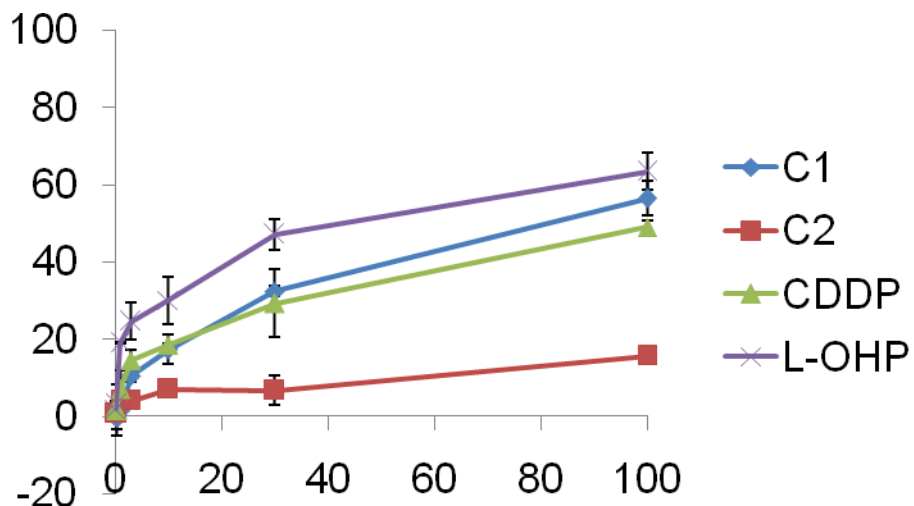
4.2.3. Цитотоксичност комплекса платине K1, K2, цисплатине и оксалплатине на културу здравих фибробласта (MRC-5)

Како је напред наведено цитотоксичност раније описаних супстанци и њихову дозну и временску зависност смо испитивали и на културама здравих фибробласта. Након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 24 часа комплексом K1 резултати показују да је цитотоксични ефекат на ове ћелијске линије у нижим концентрацијама 0.1-10 μM испод 20%. У концентрацији од 30 μM ($21.22 \pm 2.23\%$), а највишој мереној концентрацији убија $44.72 \pm 3.15\%$ ћелија. Комплекс K2 има значајно мањи ефекат на ове ћелије и у највишој концентрацији од 100 μM убија $12.75 \pm 5.49\%$ ћелија. Цитотоксичност цисплатине је до највише концентрације једноцифрена (до 5%) а у концентрацији од 100 μM износи $28.96 \pm 4.60\%$. Слично њој али статистички значајно мање оксалплатина у концентрацији 30 μM убија $14.53 \pm 3.82\%$ ћелија а 100 μM ($19.43 \pm 1.72\%$) (Графикон 7).



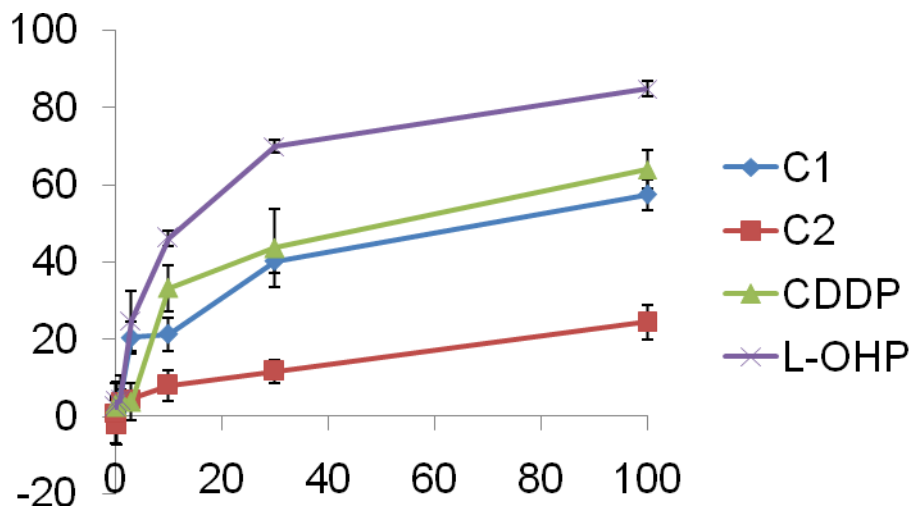
Графикон 7. Цитотоксичности комплекса К1 и К2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу ћелија здравих фибробласта (MRC-5) након инкубације од 24 часа

У току инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 48 часоваа комплексом К1 добили смо податке да порсатом концентрације К1 комплекса до 10 μM цитотоксичност расте до 17.26±3.81%, преко 32.5±1.24% до максималних 56.55±4.60% при концентрацији од 100 μM. Цитотоксичност Комплекса К2 је максимална у 100 μM концентрацији и износи 15.67±1.72%. И у овом случају временска зависност цисплатине долази до изражаја где при 10 μM концентрацији износи 18.44±0.40%, 30 μM (29.30±8.83%) а 100 μM концентрација убија 49.08±1.56% вијабилних ћелија. У овој фази анализе добили смо резултате који показују изразиту дозну и временску зависност оксалплатине која и при нижим концентрацијама од 1 μM има цитотоксичност 19.00±0.10 да би експоненцијално растао до 63.46±4.84% при концентрацији од 100 μM (*Графикон 8*).



Графикон 8. Цитотоксичности комплекса K1 и K2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу ћелија здравих фибробласта (MRC-5) након инкубације од 48 часова

Анализом цитотоксичности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 72 часа комплексом K1 добили смо податке да цитотоксичност практично није промењена у односу на ону од 48 часова инкубације креће се од $20.42 \pm 4.15\%$ на $3 \mu\text{M}$ до максималних $57.48 \pm 2.03\%$ са $100 \mu\text{M}$. K2 комплекс показује на $30 \mu\text{M}$ $11.62 \pm 3.10\%$ а на $100 \mu\text{M}$ $24.37 \pm 4.34\%$. Цисплатина временски зависна повећава цитотоксичност након 72 часа са $10 \mu\text{M}$ има $33.17 \pm 6.12\%$, $30 \mu\text{M}$ ($43.62 \pm 9.96\%$) и $100 \mu\text{M}$ ($64.00 \pm 4.84\%$). И коначно оксалплатина показује највћу цитотоксичност у овој фази која у свим концентрацијама превазилази друге супстанце од $3 \mu\text{M}$ ($24.82 \pm 7.75\%$) до максималних $84.84 \pm 2.03\%$ при концентрацији од $100 \mu\text{M}$. (графикон 9)



Графикон 9. Цитотоксичности комплекса K1 и K2, цисплатине (CDDP) и оксалплатине (L-OHP) на културу ћелија здравих фибробласта (MRC-5) након инкубације од 72 часова

4.3. IC₅₀ вредности испитиваних једињења

Анализом резултата ћелијске цитотоксичности синтетисаних комплекса и контрола дошли смо до вредности која представља концентрацију одређеног једињења која смањује број вијабилних ћелија на 50% то је тзв. IC₅₀ вредност. Након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 24 часа комплексом K1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 8.8±1.0 µM. Са друге стране након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 24 часа комплексом K2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 193.3±14.5 µM што је статистички значајно већа вредност. Анализом цитотоксичности цисплатине на ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) после инкубације од 24 часа резултати показују да IC₅₀ вредност износи 138.4±14.7 µM, и ти резултати показују да је цисплатина статистички значајно након инкубације од 24 часа ефикаснија од K2 комплекса али мање ефикасна од K1 комплекса. Резултати ефикасности оксалплатине на хумане ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) после инкубације од 24 часа показују да IC₅₀ вредност износи 11.7±1.6 µM. Анализом овог резултата добијамо податак да цитотоксичност оксалплатине на хумане ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) нема статистички значајна одступања у односу на K1

комплекс. Са друге стране показано је да ефикасност оксалплатине већа од цисплатине а нарочито од К2 комплекса (*Табела 6*).

Табела 6. IC₅₀ вредности након инкубације културе хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231) од 24 часа са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 24 сата (µМ)
К1	8.8±1.0
К2	193.3±14.5
цисплатина (CDDP)	138.4±14.7
оксалплатина(L-OHP)	11.7±1.6

Анализом резултата након 48 часова инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 48 часова комплексом К1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 7.3±0.7 µМ. Са друге стране након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 48 часова комплексом К2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 174.8±9.3 µМ што је поново показано као статистички значајно већа вредност. Анализом цитотоксичности цисплатине на ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) после инкубације од 48 часова резултати показују да IC₅₀ вредност износи 67.2±3.1 µМ, и ти резултати показују да је цисплатина статистички значајно након инкубације од 48 часова ефикаснија од К2 комплекса али у узразито већој мери него након 24 часа али је и даље мање ефикасна од К1 комплекса. Резултати ефикасности оксалплатине на хумане ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) после инкубације од 48 часова показују да IC₅₀ вредност износи 7.5±0.9 µМ. Анализом овог резултата добијамо податак да цитотоксичност оксалплатине на хумане ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) нема статистички значајна одступања у односу на К1 комплекс. Са друге стране показано је да ефикасност оксалплатине већа од цисплатине (али је та разлика мања него након инкубације од 24 часа а нарочито од К2 комплекса) (*Табела 7*).

Табела 7. IC₅₀ вредности након инкубације културе хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231) од 48 часова са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 48 сати (µМ)
K1	7.3±0.7
K2	174.8±9.3
цисплатина (CDDP)	67.2±3.1
оксалплатина(L-ОНР)	7.5±0.9

Добијене податке након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 72 часа комплексом K1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 6.2±1.1 µМ. Такође након инкубације хумане културе карцинома дојке (MDA-MB-231) од 72 часа комплексом K2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 91.1±4.8 µМ што је поново показано као статистички значајно већа вредност али и показатељ временске зависности у ефикасности овог комплекса у поређењу са IC₅₀ вредностима за 24 односно 48 часова. Анализом цитотоксичности цисплатине на ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) после инкубације од 72 часа резултати показују да IC₅₀ вредност износи 28.9±1.8 µМ, и ти резултати показују да је цисплатина статистички значајно након инкубације од 72 часа ефикаснија од K2 комплекса али у узразито већој мери него након 48 часова али је и даље мање ефикасна од K1 комплекса. И након 72 часа IC₅₀ вредност цисплатине је статистички значајно већа од K1 комплекса. Резултати ефикасности оксалплатине на хумане ћелије културе карцинома дојке (MDA-MB-231) после инкубације од 72 часа показују да IC₅₀ вредност износи 2.7±1.0 µМ (**Табела 8**).

Табела 8. IC₅₀ вредности након инкубације културе хуманих ћелија карцинома дојке (MDA-MB-231) од 72 часа са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 72 сата (µМ)
K1	6.2±1.1
K2	91.1±4.8
цисплатина (CDDP)	28.9±1.8
оксалплатина(L-ОНР)	2.7±1.0

Осим на ћелијама хуманог порекла анализа је рађена и на ћелијама анималног, мишјег порекла (4Т1 ћелијка линија). Након инкубације мишје културе карцинома дојке (4Т1) од 24 часа комплексом К1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 14.3±1.3µМ. Са друге стране након инкубације мишје културе карцинома дојке (4Т1) од 24 часа комплексом К2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи >500 µМ што је статистички значајно већа вредност. Анализом цитотоксичности цисплатине на ћелије културе карцинома дојке миша (4Т1) после инкубације од 24 часа резултати показују да IC₅₀ вредност износи 154.8±12.4 µМ, и ти резултати показују да је цисплатина статистички значајно након инкубације од 24 часа ефикаснија од К2 комплекса али далеко мање ефикасна од К1 комплекса. Резултати ефикасности оксалплатине на мишје ћелије културе карцинома дојке (4Т1) после инкубације од 24 часа показују да IC₅₀ вредност износи 179.3±10.2 µМ. Анализом овог резултата добијамо податак да цитотоксичност оксалплатине на мишје ћелије културе карцинома дојке (4Т1) има статистички значајна одступања у односу на К1 комплекс (*Табела 9*).

Табела 9. IC₅₀ вредности након инкубације културе мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) од 24 часа са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 24 сата (μM)
K1	14.3±1.3
K2	>500
цисплатина (CDDP)	154.8±12.4
оксалплатина(L-ОНР)	179.3±10.2

Када смо културу мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) инкубирали 48 часова комплексом K1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 8.7±0.6 μM. Са друге стране након инкубације мишје културе карцинома дојке (4T1) од 48 часова комплексом K2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 190.4±10.2 μM. Анализом цитотоксичности цисплатине на ћелије културе карцинома дојке миша (4T1) после инкубације од 48 часова резултати показују да IC₅₀ вредност износи 58.1±4.0 μM, и ти резултати показују да је цисплатина статистички значајно након инкубације од 48 часова ефикаснија од K2. Резултати ефикасности оксалплатине на мишје ћелије културе карцинома дојке (4T1) после инкубације од 48 часова показују да IC₅₀ вредност износи 47.6±3.2 μM. Анализом овог резултата добијамо податак да цитотоксичност оксалплатине на мишје ћелије културе карцинома дојке (4T1) има статистички значајна одступања у односу на K1 комплекс и цисплатину у смислу мање ефикасности (**Табела 10**).

Табела 10. IC₅₀ вредности након инкубације културе мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) од 48 часова са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 48 сати (μМ)
K1	8.7±0.6
K2	190.4±10.2
цисплатина (CDDP)	58.1±4.0
оксалплатина(L-ОНР)	47.6±3.2

Третирањем културе мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) након инкубације од 72 часа комплексом K1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 6.9±1.2 μМ што је најмања вредност у односу на 24 и 48 часова инкубације. Надаље, након инкубације мишје културе карцинома дојке (4T1) од 72 часа комплексом K2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 151.3±9.6 μМ. Анализом цитотоксичности цисплатине на ћелије културе карцинома дојке миша (4T1) после инкубације од 48 часова резултати показују да IC₅₀ вредност износи 2.7±0.4 μМ. Резултати ефикасности оксалплатине на мишје ћелије културе карцинома дојке (4T1) после инкубације од 48 часова показују да IC₅₀ вредност износи 2.1±0.9 μМ. Анализом овог резултата добијамо податак да цитотоксичност оксалплатине, цисплатине и C1 комплекса на мишје ћелије културе карцинома дојке (4T1) има статистички значајна одступања у односу на C2 комплекс у смислу веће ефикасности (*Табела 11*).

Табела 11. IC₅₀ вредности након инкубације културе мишјих ћелија карцинома дојке (4T1) од 72 часа са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 72 сата (μМ)
К1	6.9±1.2
К2	151.3±9.6
цисплатина (CDDP)	2.7±0.4
оксалплатина(L-ОНР)	2.1±0.9

Како је напред наведено цитотоксичност раније описаних супстанци и њихову дозну и временску зависност смо испитивали и на културама здравих фибробласта. Након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 24 часа комплексом К1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 114.8±12.8μМ. Са друге стране након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 24 часа комплексом К2 резултати показују да IC₅₀ вредност износи >500 μМ што је статистички значајно већа вредност. Анализом цитотоксичности цисплатине на културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) после инкубације од 24 часа резултати показују да IC₅₀ вредност износи 372.6±28.3 μМ. Резултати цитотоксичности оксалплатине на културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) после инкубације од 24 часа показују да IC₅₀ вредност износи 268.3±17.9 μМ (*Табела 12*).

Табела 12. IC₅₀ вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 24 часа са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 24 сата (µM)
K1	114.8±12.8
K2	>500
цисплатина (CDDP)	372.6±28.3
оксалплатина(L-ОНР)	268.3±17.9

Анализом резултата након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 48 часова комплексом K1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 107.1±6.3 µM. Даље након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 48 часова комплексом K2 резултати показују да IC₅₀ вредност поново износи >500 µM. Анализом цитотоксичности цисплатине на културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) после инкубације од 48 часова резултати показују да IC₅₀ вредност износи 101.7±6.9 µM. Резултати цитотоксичности оксалплатине на културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) после инкубације од 48 часова показују да IC₅₀ вредност износи 38.6±2.1 µM (*Табела 13*).

Табела 13. IC₅₀ вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 48 часова са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 48 сата (μM)
K1	107.1±6.3
K2	>500
цисплатина (CDDP)	101.7±6.9
оксалплатина(L-ОНР)	38.6±2.1

После инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 72 часа комплексом K1 резултати показују да IC₅₀ вредност износи 121±4.7 μM. Даље након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 72 часа комплексом K2 резултати показују да IC₅₀ вредност поново износи 401.0±17.6 μM. Анализом цитотоксичности цисплатине на културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) после инкубације од 72 часа резултати показују да IC₅₀ вредност износи 39.4±2.5 μM. Резултати цитотоксичности оксалплатине на културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) после инкубације од 72 часа показују да IC₅₀ вредност износи 11.6±1.3 μM (*Табела 14*).

Табела 14. IC₅₀ вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5) од 72 часа са одређеним испитиваним једињењем. Подаци су изражени као средња вредност ± стандардна девијација.

Једињење	IC ₅₀ вредност за 72 сата (μM)

K1	121±4.7
K2	401.0±17.6
цисплатина (CDDP)	39.4±2.5
оксалплатина(L-OHP)	11.6±1.3

4.4. Индекси селективности испитиваних једињења

Узимајући у обзир све добијене резултате израчунали смо индекс селективности за сваку од коришћених супстанци. Индекс селективности је однос IC_{50} вредности добијене на култури ћелија здравих фибробласта (MRC-5) подељена са IC_{50} вредности добијене на одређеној карциномској линији, након 24, 48 односно 72 сата инкубације. Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација. Анализом података након 24 сата инкубације (MDA-MB-231) линије налазимо да је индекс селективности комплекса K1 13.0, K2 (2.6), цисплатине (2.7) а оксалплатина има највиши и износи 22.9 (**Табела 15**).

Табела 15. Индекс селективности: IC_{50} вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5)/ IC_{50} вредности након инкубације од 24 часа са хуманом културом карцинома дојке (MDA-MB-231) Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (MRC-5)/ IC_{50} (MDA-MB-231) за 24 сата
K1	13.0±1.1
K2	2.6±0.2
цисплатина (CDDP)	2.7±0.2
оксалплатина(L-OHP)	22.9 \pm 0.3

Анализом података након 48 сати инкубације (MDA-MB-231) линије налазимо да је индекс селективности комплекса К1 14.7, К2 (2.9), цисплатине (1.5) а оксалплатина 5.1 (*Табела 16*).

Табела 16. Индекс селективности: IC_{50} вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5)/ IC_{50} вредности након инкубације од 48 часова са хуманом културом карцинома дојке (MDA-MB-231) Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (MRC-5)/ IC_{50} (MDA-MB-231) за 48 сати
К1	14.7 \pm 1.1
К2	2.9 \pm 0.2
цисплатина (CDDP)	1.5 \pm 0.2
оксалплатина(L-OHP)	5.1 \pm 0.3

Након 72 сата инкубације запажамо да је када је индекс селективности у питању комплекс К1 према хуманој култури карцинома дојке (MDA-MB-231) највиши и износи 17.4 \pm 1.1. Индекс селективности комплекса К2 је 4.4 \pm 0.2. Цисплатина има најнижи индекс селективности и износи 1.4 \pm 0.1. Оксалплатина је по селективности слична комплексу К 2 (4.3 \pm 0.3) (*Табела 17*).

Табела 17. Индекс селективности: IC_{50} вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5)/ IC_{50} вредности након инкубације од 72 сата са хуманом културом карцинома дојке (MDA-MB-231) Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (MRC-5)/ IC_{50} (MDA-MB-231) за 72 сата
K1	17.4 \pm 1.1
K2	4.4 \pm 0.2
цисплатина (CDDP)	1.4 \pm 0.1
оксалплатина(L-OHP)	4.3 \pm 0.3

Индекс селективности на културу малигних ћелија карцинома дојке миша (4T1) је израчунат на исти начин. Након третмана од 24 сата K1 комплекс показује индекс селективности 8.0. K2 комплекс испољава немерљив индекс селективности у овој фази, цисплатина 2.4 а оксалплатина 1.5 (*Табела 18*)

Табела 18. Индекс селективности: IC_{50} вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5)/ IC_{50} вредности након инкубације у трајању од 24 сата са мишјом културом карцинома дојке (4T1). Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (MRC-5)/ IC_{50} (4T1) за 24 сата
K1	8.0 \pm 0.9
K2	NA
цисплатина (CDDP)	2.4 \pm 0.9
оксалплатина(L-OHP)	1.5 \pm 0.6

Након третмана од 48 сати добили смо следеће резултате индекса селективности. Комплекс K1 и даље има највећи овај индекс и износи 12.3. Ка показује индекс од 2.6, цисплатина 1.8 док је индекс селективности оксалплатине на најнижем нивоу и износи 0.8 (*Табела 19*).

Табела 19. Индекс селективности: IC_{50} вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5)/ IC_{50} вредности након инкубације са мишјом културом карцинома дојке (4T1) у трајању од 48 сати. Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (MRC-5)/ IC_{50} (4T1) за 48 сати
K1	12.3 \pm 0.9

K2	2.6±0.2
цисплатина (CDDP)	1.8±0.9
оксалплатина(L-ОНР)	0.8±0.3

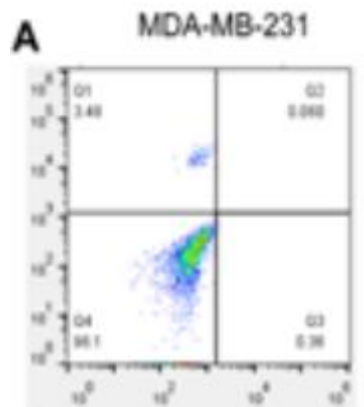
Анализом података након 72 сата увидели смо да К1 комплекс има највиши индекс селективности и износи 15.5 ± 0.9 , К2 комплекс је са најнижим индексом (2.7 ± 0.2). Цисплатина је вишег нивоа селективности него на хуманим линијама и износи 14.6 ± 0.9 . Оксалплатина има индекс селективности 5.5 ± 0.6 (*Табела 20*).

Табела 20. Индекс селективности: IC_{50} вредности након инкубације културе ћелија здравих фибробласта (MRC-5)/ IC_{50} вредности након инкубације са мишјом културом карцинома дојке (4T1) у трајању од 72 сата. Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

Једињење	IC_{50} (MRC-5)/ IC_{50} (4T1) за 72 сата
K1	15.5±0.9
K2	2.7±0.2
цисплатина (CDDP)	14.6±0.9
оксалплатина(L-ОНР)	5.5±0.6

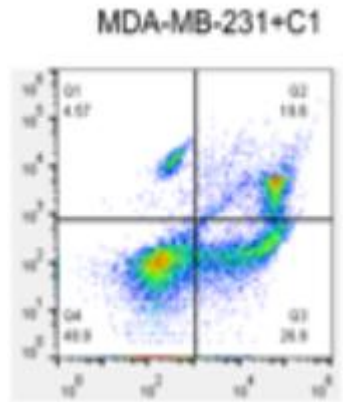
4.5. Новосинтетисани комплекси платине K1 и K2 делују цитотоксично тако што код малигнух ћелија карцинома дојке хуманог и анималног порекла изаивају апоптозу

Уопштено узети у озир све механизме ћелијске смрти, обзиром на њихове последице најжењенији догађј у антитуморском деловању је да неки агенс делије тако што индукује апоптозу. Обе испитаване ћелијске културе су анализирани. Третиране су IC_{50} вредностима комплекса платине K1 и K2 а контрола су биле нетретиране ћелијске културе. По инкубацији од 24 часа са испитиваним супстанцама бојене Annexin V / PI анализом је добијен проценат ћелија који је у апоптози. Анализом након инкубације K1 и K2 комплекса са хуманом културом карцинома дојке (MDA-MB-231) и нетретираних ћелија добијамо резултат да је код $3.5 \pm 0.21\%$ нетретираних ћелија било некротично, $0.10 \pm \%$ се налазило у раној и касној апоптози, док се $85.45 \pm .\%$ што је и очекивано било виабилно (*Графикон 10*).



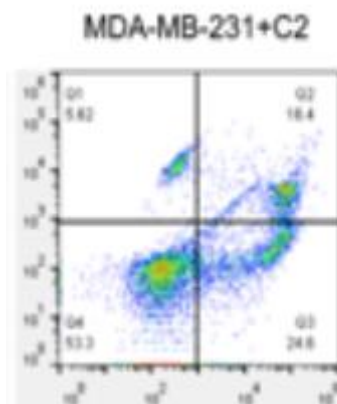
Графикон 10. Проточна цитометријска анализа бојења по Annexin V-FITC / PI. Тачкасти дијаграм представља проценат вијабилних ћелија (доњи леви квадрант), ћелија у фази ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и некротичне ћелије (горњи леви квадрант) ћелије у нетретираним (MDA- MB-231) ћелијама

Када анализирамо K1 комплекс уочавамо да он изазива апоптозу и то касну у $20.50 \pm$ % односно рану у $27.00 \pm$ %. K1 комплекс је изазвао некрозу код $4.50 \pm$ % ћелија (Графикон 11.)



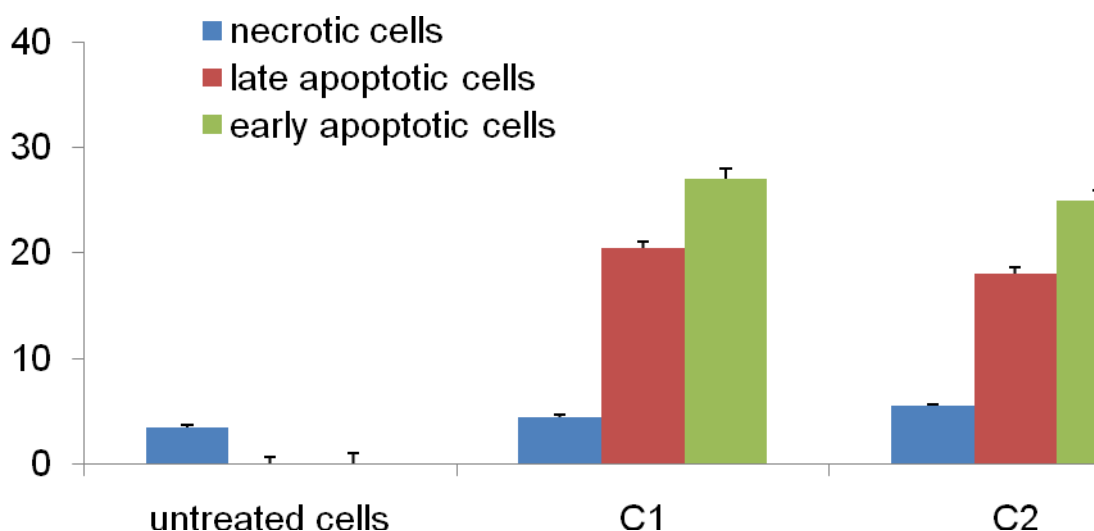
Графикон 11. Проточна цитометријска анализа бојења по Annexin V-FITC / PI. Тачкасти дијаграм представља проценат вијабилних ћелија (доњи леви квадрант), ћелија у фази ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и некротичне ћелије (горњи леви квадрант) ћелије у (MDA- MB-231) ћелијама које су третиране комплексом K1

Са друге стране K2 комплекс након инкубације доводи до касне апоптозе у $18 \pm$ % случајева а $25.00 \pm$ % ћелија се налазило у раној апоптози. Комплекс K2 изазива некрозу у $5.60 \pm$ % (Графикон 12).



Графикон 12. Проточна цитометријска анализа бојења по Annexin V-FITC / PI. Тачкасти дијаграм представља проценат вијабилних ћелија (доњи леви квадрант), ћелија у фази ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и некротичне ћелије (горњи леви квадрант) ћелијама у (MDA- MB-231) ћелијама које су третиране комплексом К2

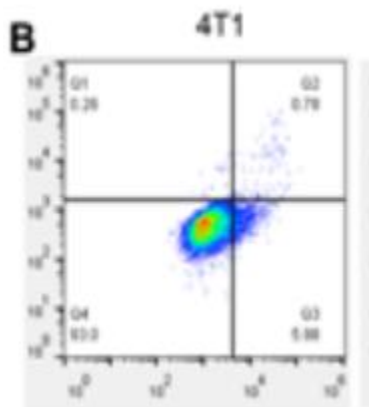
Сви горе наведени резултати су сумарно и прегледно приказани на *Графикону 13.*



Графикон 13. Просечан проценат некротичних, касних апоптотских и рано апоптотских ћелија хумане културе (MDA-MB-231) након третмана са IC_{50} вредностима К1 и К2 комплекса у поређењу са нетретираним ћелијама. Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

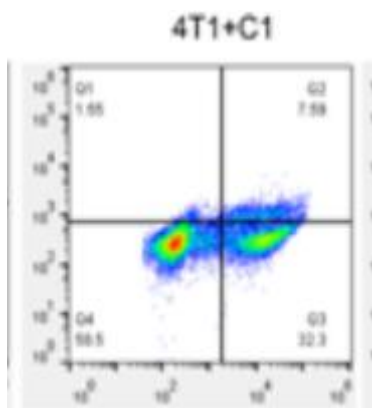
Анализом након инкубације К1 и К2 комплекса са мишјом културом карцинома дојке (4Т1) и нетретираних ћелија добијамо резултат да је код $1 \pm 0.30\%$ нетретираних ћелија

било некротично, 1 ± 0.20 % се налазило у касној апоптози, док се 6 ± 0.70 % налазило у фази ране апоптозе (**Графикон 14**).



Графикон 14. Проточна цитометријска анализа бојења по Annexin V-FITC / PI. Тачкасти дијаграм представља проценат вијабилних ћелија (доњи леви квадрант), ћелија у фази ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и некротичне ћелије (горњи леви квадрант) ћелије у нетретираним (4T1) ћелијама

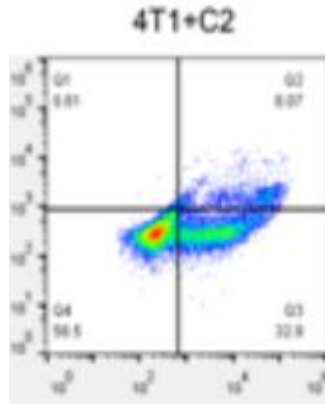
Када анализирамо K1 комплекс уочавамо да он изазива апоптозу и то касну у 7.80 ± 0.50 % односно рану у 3.50 ± 1.50 %. K1 комплекс је изазвао некрозу код 1.60 ± 0.40 % (**Графикон 15**).



Графикон 15. Проточна цитометријска анализа бојења по Annexin V-FITC / PI. Тачкасти дијаграм представља проценат вијабилних ћелија (доњи леви квадрант), ћелија у фази ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и

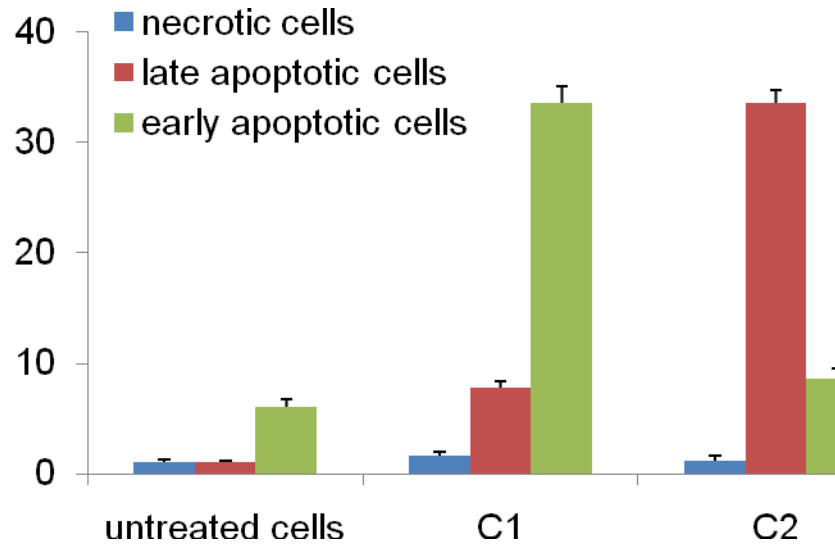
некротичне ћелије (горњи леви квадрант) ћелије у (4Т1) ћелијама третираним комплексом
К1

Са друге стране К2 комплекс након инкубације доводи до касне апоптозе у $33.50 \pm 1.20\%$ случајева а $8.60 \pm 0.90\%$ ћелија се налазило у раној апоптози. Некрозу изазива код $1.20 \pm 0.40\%$ ћелија (*Графикон 16*).



Графикон 16. Проточна цитометријска анализа бојења по Annexin V-FITC / PI. Тачкасти дијаграм представља проценат вијабилних ћелија (доњи леви квадрант), ћелија у фази ране апоптозе (доњи десни квадрант), касне апоптозе (горњи десни квадрант) и некротичне ћелије (горњи леви квадрант) ћелије у (4Т1) ћелијама третираним комплексом
К2

Сви горе наведени резултати су сумарно и прегледно приказани на *Графикону 17*.

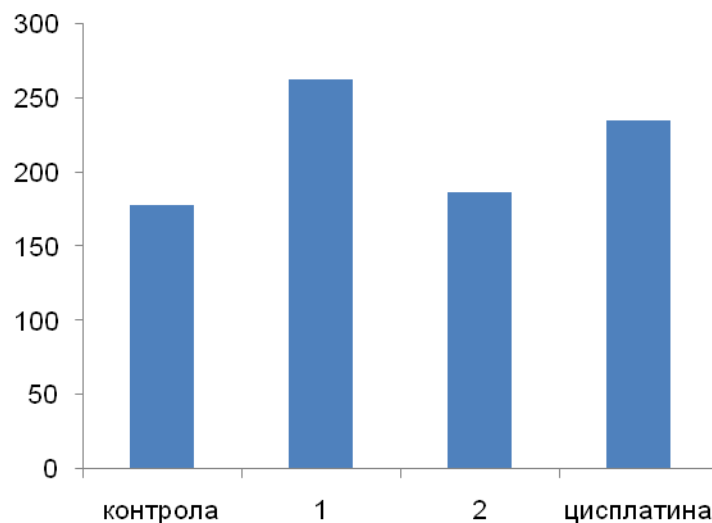


Графикон 17. Просечан проценат некротичних, касних апоптотских и рано апоптотских ћелија мишије културе (4T1) након третмана са IC_{50} вредностима K1 и K2 комплекса у поређењу са нетретираним ћелијама. Подаци су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.6. Комплекси платине K1 и K2 покрећу митохондријални сигнални пут апоптозе

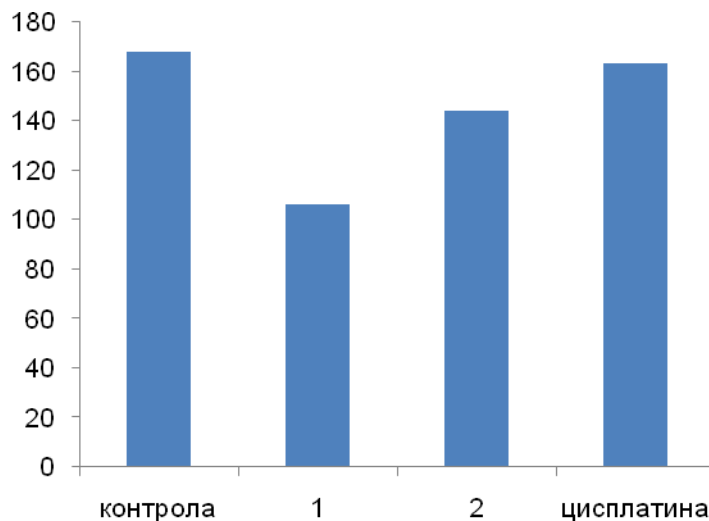
Као што је у уводним разматрањима наведено програмирана ћелијска смрт ће се може индуковати спољашњим каспазом-8 индукованим путем где кључну улогу имају тзв. рецептори смрти или унутрашњим каспаза-3 индукованим путем. (80 пера) Овај унутрашњи пут активације настаје као последица дисбаланса проапоптотичног Вах и антиапоптотичног Bcl-2 протеина. Када дође до овог дисбаланса Вах протеин бива транслокован из цитоплазме на спољашњу мембрану митохондрије где се ослободи цитохром c који се налази између две митохондријалне мембране. Његов прелазак у цитоплазму резултира активацијом каспазе 9 и 3 и следственој активацији апоптозе (149, 150 пера). У нашем истраживању смо две ћелијске културе хуману, (MDA-MB-231) и

мишћу (4T1) третирали новосинтетисаним динуклеарним комплексима K1 и K2 и то њиховим IC₅₀ вредностима. Анализирали смо њихов утицај на активацију и експресију кључних протеина апоптозе: Вах, Bcl-2, и каспазу-3. Након третмана од 24 часа ћелијске линије третираних K1, K2 комплексима али и нетретиране ћелије су бојене специфичним примарним и секундарним антителима на ове протеине. Узимајући у обзир однос просечног интензитета флуоресценције за протеине апоптозе у односу на контролу и анализом процента ћелија које емитују одређену флуоресценцију добили смо ниво експресије и активације кључних протеина апоптозе. Анализом наших резултата на ћелијској линији (MDA-MB-231) закључили смо да комплекси K1 и K2 индукују апоптозу повећањем експресије проапоптотичног протеина Вах у поређењу са нетретираним ћелијама. MFI резултати за овај протеин су следећи: K1 (262.5), K2 (187.1), цисплатина (234.8), контрола (178.4). Анализом ових резултата видимо да Комплекс K1 доминантније у односу на K2 и цисплатину повећана вибо експресије проапоптотског Вах протеина (*Графикон 18*).



Графикон 18. Утицај комплекса платине K1, K2 и цисплатине на ниво проапоптотског Вах протеина на (MDA- MB-231) линији изражен у јединици просечног интензитета флуоресценције (енг. MFI - mean fluorescence intensity). Контрола је нетретирана култура ћелија

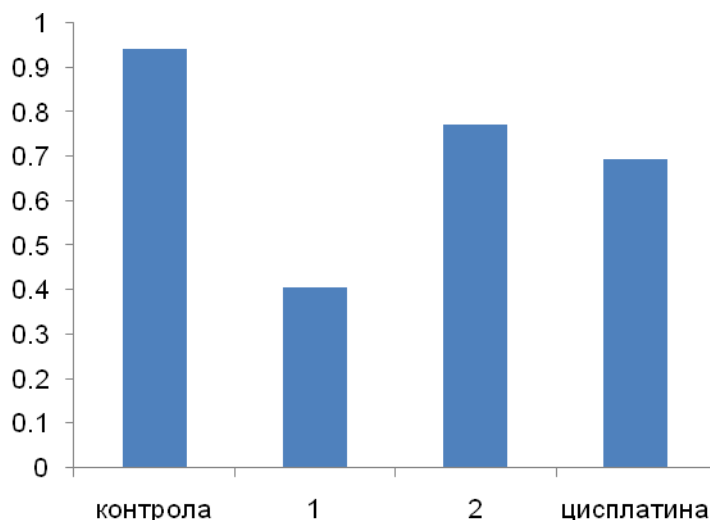
Осим тога анализом резултата након третмана дошло је до статистички значајног смањења експресије антиапоптоичког Bcl-2 у односу на нетретирану ћелиску културу. Мерењем резултата проточне цитометрије добили смо да комплекс К1 има вредност 106.3, комплекс К2 144.3 а цисплатина 163.4 што у поређењу са контролом 168 даје закључак да оба комплекса смањују интензитет флуоресценције односно експресије и активације антиапоптоичког Bcl-2 протеина (*Графикон 19*).



Графикон 19. Утицај комплекса платине К1, К2 и цисплатине на ниво антиапоптоичког Bcl-2 протеина у (MDA- MB-231) линији изражен у јединици просечног интензитета флуоресценције (енг. MFI - mean fluorescence intensity). Контрола је нетретирана култура ћелија.

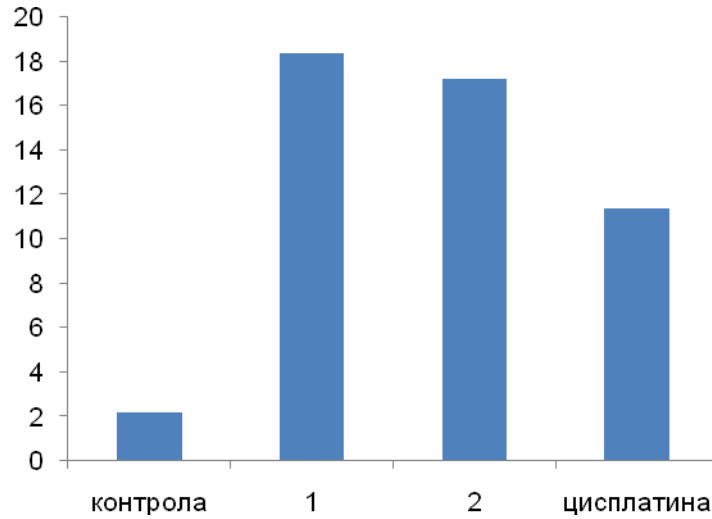
Када смо добили резултате да третиране ћелије у односу на нетретиране показују пораст (MFI) проапоптоичког Вах протеина а смањење (MFI) антиапоптоичког Bcl-2, закључили смо да комплекси платине К1 и К2 значајно смањују однос Bcl-2/Вах у односу на групу нетретираних ћелија. Овај однос је израчунат и добијени су следећи подаци К1 (0.404952), К2 (0.771245), цисплатина (0.695911), контрола (0.941704). Анализом ових резултата видимо да ова вредност као што је и очекивано код контроле

тежи броју 1. Аналогно томе К1 комплекс је најефикаснији од понуђених резултата, а ефекат цисплатине и К2 је приближан (*Графикон 20*).



Графикон 20. Однос вредности MFI за антиапоптотски Bcl-2/ проапоптотски Вах код третираних (MDA- MB-231) линија комплекса К1, К2 и цисплатином. Контрола је нетретирана група ћелија.

По добијању резултата да комплекси К1 и К2 смањују однос Bcl-2/Bax, наставили смо са испитивањем у смислу да ли код ових третираних ћелија има више оних које емитију флуоресценцију за активну каспазу 3 као ефектора унутрашњег пута апоптозе. Анализом ових резултата у односу на резултате нетретираних ћелија дошли смо до закључка да статистички значајно након третмана ћелије емитију флуоресценцију за каспазу 3 у односу на нетретиране. Сви ови наведени резултати говоре у прилог да динуклеарни комплекси платине К1 и К2 индукују унутрашњи, митохондријални, пут апоптозе. Конкретно вредности износе: К1 (18.4), К2 (17.2), цисплатина (11.4), контрола (2.2), (*Графикон 21*).



Графикон 21. Анализа вредности MFI за флуоресценцу активне капазе 3 након третмана (MDA- MB-231) линије комплексима K1, K2 и цисплатином. Контрола је нетретирана култура ћелија.

Сумирани резултати анализе протеина апоптозе су прегледно дати у **табели 21**.

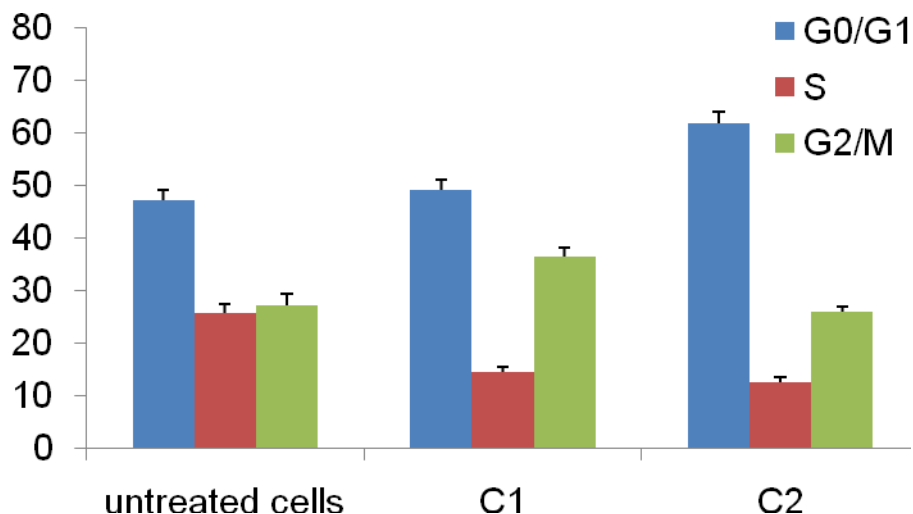
MDA-MB-231	Bcl-2	Bax	Bcl2/Bax однос	активна каспаза-3
	MFI	MFI		%
контрола	168	178.4	0.9	2.2
K1	106.3	262.5	0.4	18.4
K2	144.3	187.1	0.8	17.2
цисплатина	163.4	234.8	0.7	11.4

Табела 21. Вредности интензитета флуоресценце за протеине апоптозе код третиране линије MDA-MB-231 комплексима K1, K2 и цисплатином. Контрола је нетретирана култура ћелија.

4.7. Новосинтетисани комплекси платине K1 и K2 делују на ћелијски циклус

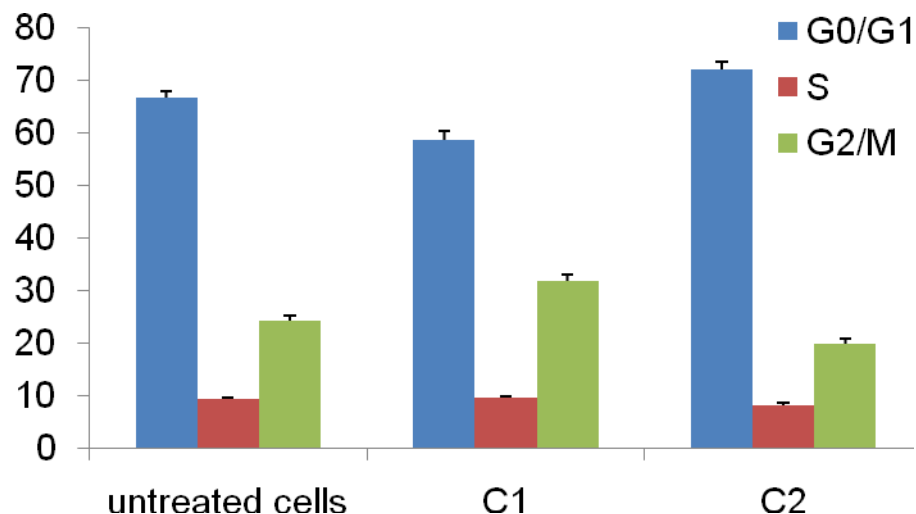
Новонастали комплекси платине K1 и K2 могу да утичу на канцерске ћелије изазивањем апоптозе код истих, или заустављањем ћелија у појединим фазама ћелијског циклуса. Треба поменути да би се заустављање ћелија у G₂/M фази ћелијског циклуса могао да буде један од путева индукције апоптозе. Са друге стране ако се заустави циклус у G₀/G₁ фази зауставља се фаза пролиферације ћелије али је омогућена поправка оштећења од стране ћелија способних за то. У нашем досадашњем истраживању показали смо да ова два комплекса делују цитотоксично тако што активирају апоптозу код канцерских ћелија. Тема нашег даљег истраживања је било да ли и у којој мери комплекси K1 и K2 утичу на поједине фазе ћелијског циклуса и у којој тачно фази заустављају циклус. Обе раније испитиване културе ћелија смо третирали са IC₅₀ вредностима K1 и K2 комплекса а контрола је била нетретирана ћелијска линија. Резултати су обрађени служећи се проточном цитометријом, бојења пропидијум јодидом, након чега су се добијали резултати да ли се под дејством агенса број ћелија нагомилава у G₀/G₁, S или G₂/M фази ћелијског циклуса.

Анализом ћелијског циклуса ћелијске културе (MDA- MB-231) након 24 сата инкубације комплексима K1 и K2 долазимо до података да се 47.20% нетретираних ћелија налази у G₀/G₁ фази, у S фази се налази 25.60% а G₂/M 27.20%. Ћелијска линија третирана комплексом K1 је према резултатима у G₀/G₁ фази имала 49.10% ћелија, у S фази се налази 14.50% а G₂/M 36.40% што представља пораст броја ћелија у G₂/M фази у односу на нетретирану групу. Након икубације од 24 сата комплексом K2 дошли смо до резултата да се у G₀/G₁ фази налази 61.70% ћелија и то је значајан пораст броја ћелија у односу на нетретирану групу. У S фази се налазило 12.40% а у G₂/M фази 25.90% (**Графикон 22**).



Графикон 22. Утицај комплекса платине K1 и K2 на дистрибуцију броја ћелија у појединим фазама ћелијског циклуса третираних и нетретираних ћелија хумане културе (MDA-MB-231) ћелија.

Анализом ћелијског циклуса ћелијске културе (4T1) након 24 сата инкубације комплексима K1 и K2 долазимо до података да се 66.6% нетретираних ћелија налази у G_0/G_1 фази, у S фази се налази 9.3% а G_2/M 24.10%. Ћелијска линија третирана комплексом K1 је према резултатима у G_0/G_1 фази имала 58.70% ћелија, у S фази се налази 9.50% а G_2/M 31.80% што представља пораст броја ћелија у G_2/M фази у односу на нетретирану групу. Након икубације од 24 сата комплексом K2 дошли смо до резултата да се у G_0/G_1 фази налази 72.10% ћелија и то је значајан пораст броја ћелија у односу на нетретирану групу. У S фази се налазило 8% а у G_2/M фази 19.90% (**Графикон 23**).



Графикон 23. Утицај комплекса платине K1 и K2 на дистрибуцију броја ћелија у појединим фазама ћелијског циклуса третираних и нетретираних ћелија мишије културе (4T1) ћелија.

Сумарно гледано динуклеарни комплекс платине који смо синтетисали K1 делује тако што зауставља ћелијски циклус у G₂/M фази ћелијског циклуса. Други синтетисани комплекс K2 делује тако што зауставља ћелијски циклус у G₀/G₁ фази ћелијског циклуса.

Наши резултати су показали да новосинтетисани комплекси платине (II) K1 и K2 делују цитотоксично на туморске ћелије хуманог и анималног порекла боље него цисплатина и оксалплатина. Са друге стране немају ниску IC₅₀ вредност на здраве фибробласте што их чини мање токсичним па би ова чињеница могла да значи да ови комплекси у перспективи могу бити мање токсични од цисплатине и оксалплатине. Такође ови комплекси смњују вијабилност обе ћелијске линије тако што изазивају унутрашњи, митохондријални пут апотозе зависне од каспазе 3 и тако изазивају смрт ћелија а са друге стране смањују раст ћелија, пролиферацију и бујање туморског ткива тако што успоравају или заустављају ћелијски циклус у некој од његових фаза.

5. Дискусија

Опште позната чињеница је да тумори нарочито малигни представљају све већи здравствено социјални проблем поготово у земљама са високим животним стандардом. Са друге стране у тзв. земљама у развоју налази на другом месту иза хроничних незаразних у првом реду кардиоваскуларних (156). Посебно је забрињавајућа чињеница да у Србији све више расте инциденца јављања малигнух болести са померањем старосне границе (157). Један од највероватнијих молекуларних механизма у трансформацији нормалне у малигну ћелију је поремећај настао као резултат бројних мутација на ДНК са губитком регулаторних механизма програмиране ћелијске смрти и ћелијског циклуса. (158). Посебну улогу у регулацији процеса апоптозе имају молекули чија је експресија, активност и локализација од посебне важности. То су у првом реду проапоптотски Вах и антиапоптотски Bcl-2 протеин. Једна од кључних карактеристика малигнух тумора је убрзана деоба услед блокаде апоптозе као резултат смањене активности Вах и повећане активности Bcl-2 протеина. Овде се баш налази кључна тачка, циљ антитуморске терапије изазивањем апоптозе. Ако делујемо на проапоптотски протеин његовом активацијом смањује се количина антиапоптопикног Bcl-2 протеина а читав овај процес има за резултат активирање унутрашњег, митохондријалног пута апоптозе који је посредован цитохромом с и каспазом 3. Ланчаном реакцијом каспаза активира се и каспаза 3 која индукује апоптозу код ћелије (159). Друга кључна тачка деловања је ћелијски циклус, тј. Његово заустављање налик оном код нормалне ћелије након деобе. Подесћања ради ова пауза је код малигне ћелије јако кратка или је нема (160).

Онколошка терапија се сусреће са бројним потешкоћама нарочито у смислу изражене токсичности и појаве резистенције и честих појава релапса болести (161). Са употребом металокомплекса у онкологији почело се још у 19. веку и прошла кроз бројне фазе напредовања. Од раних, почетних радова о предклиничким и клиничким испитивањима цисплатине синтетисано је и испитивано неколико хиљада различитих аналога у циљу постизања својстава која би омогућила бољу терапијску примену. Од наведеног броја само 13 аналога је уведено у клиничку фазу истраживања, а само за један од њих (карбаплатин

или карбоплатина) показана је извесна предност у односу на цисплатину и ушао је у примену широм света (162, 163). Поред карбоплатине, која је у клиничку употребу уведена 1989. године, једини аналог цисплатине који се користи у клиничкој пракси је још оксалиплатина, која је у клиничку праксу уведена 2002. године (164, 165).

На молекулском нивоу, цисплатина је савршени пример који илуструје како мале промене у структури знатно мењају биолошку активност у циљним ћелијама (166).

Први корак у анализи нових ефикасности агенаса метала је испитивање њиховог утицаја *in vitro* на туморске ћелијске линије применом теста цитотоксичности (МТТ теста).

У нашем истраживању смо анализирали утицај динуклеарних комплекса платине (II) $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ (где је 1,7-phen мостни лиганд 1,7-фенантролин), (у тексту обележен као: комплекс K1) и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$ (где је 4,7-phen мостни лиганд 4,7-фенантролин) (у тексту обележен: комплекс K2) на следећим туморским ћелијама: MDA-MB-231 – хумана ћелијска линија карцинома дојке и 4T1 – анимална ћелијска линија карцинома дојке. Осим туморских и здраве ћелије су третиране као контрола (MRC-5– фибробласти). За истраживање смо користили МТТ тест а кључни резултат за анализу је добијена вредност IC_{50} која представља ону концентрацију супстанце која смњује број вијабилних ћелија на половину. Анализом IC_{50} вредности којима је третирана хумана MDA-MB-231 линија добили смо следеће резултате: K1 комплекс након 24 часа инкубације далеко боље делује на ове ћелије од K2, цисплатине и оксалиплатине има вредност IC_{50} $8.8 \pm 1.0 \mu M$. Са поратсом дужине третмана на 48 сати односно 72 сата мерена IC_{50} вредност благо опада 7.3 ± 0.7 , па $6.2 \pm 1.1 \mu M$. Вредности IC_{50} комплекса K2 након 24, 48 односно 72 сата износе 193.3 ± 14.5 , 174.8 ± 9.3 и $91.1 \pm 4.8 \mu M$. Даље, вредности IC_{50} цисплатине након 24, 48 односно 72 сата износе 138.4 ± 14.7 , 67.2 ± 3.1 и $28.9 \pm 1.8 \mu M$. Исту ову ћелијску линију смо третирали и оксалиплатином и добили следеће IC_{50} вредности за 24, 48 односно 72 сата третмана: 11.7 ± 1 , 7.5 ± 0.9 , $2.7 \pm 1.0 \mu M$. Као што ј наведено код свих супстанци којима смо третирали MDA-MB-231 ћелијску линију постоји временска зависност и како дужина третмана расте опада IC_{50} вредност.

Своје резултате смо упоредили са онима из доступне литертуре. *Emma Bauer* и сарадници су синтетисали шест нових циклометалованих комплекса платине IV јодида и своје резултате објавили у раду (167). Они су такође упоређивали ефикасност ових

комплекса на MDA-MB-231 у односу на цисплатину коју смо и ми користили. Анализом добијених IC₅₀ вредности за деловање цисплатине на ову ћелијску линију њихов резултат након 72 сата инкубације је 12.31 ± 0.40 а наш 28.9 ± 1.8 μM што овај рад чини компарабилним са нашим резултатима. Резултати IC₅₀ вредности свих 6 комплекса које су користили на MDA-MB-231 линји су се кретали од 2.06 ± 0.51 μM као најмања вредност до 14.10 ± 4.07 μM које је највећа вредност. Од већине комплекса из њихове палете је наш комплекс K1 имаи нижу вредност IC₅₀ 6.2 ± 1.1 μM . Комплекс K2 у поређењу са комплексима *Emme Bauer* и сарадника има лошију ефикасност. *Robert Czarnomysy* и сарадници су испитивали ефекат три нова платинаста комплекса: Pt2 (2,4-dimetilpiridin) 4 (berenil) 2 (Pt14), Pt2 (3,4-dimetilpiridin) 4 (berenil) 2 (Pt15) и Pt2 (3,5-dimetilpiridin)) 4 (berenil) 2 (Pt16) на MDA-MB-231 ћелијску линију (168). И они су као контролу користили циплатину. Анализом њихових резултата су показали да је након 24 сата инкубације IC₅₀ од Pt14-Pt16 био 42 ± 3 μM , 19 ± 3 μM и 67 ± 2 μM ћелија MDA MB-231 и то су далеко веће вредности у односу на наше резултате K1 8.8 ± 1.0 μM . Са друге стране наши резултати K2 комплекса од 193.3 ± 14.5 μM показују да су резултати нашег K1 комплекса бољи али K2 комплекс има лошије резултате у односу на ова три Pt14-Pt16. После 24 сата инкубације платине IC₅₀ вредности на MDA-MB-231 износи 82 ± 2 μM . *Rong Huang* и сарадници су користили нови коњугат који се састоји од Херцептина (anti-HER2) антитела и лека платине у циљу повећања ефикасности (169). Кад се подаци пореде са нашим на MDA MB-231 ћелијској линији видимо да њихов коњугат има IC₅₀ вредност од 38.3 ± 0.9 μM што је лошија вредност у односу на наш K1 комплекс (8.8 ± 1.0 μM) али боља у односу на K2 комплекс (91.1 ± 4.8 μM). Они су као контролу користили оксалплатину (IC₅₀ вредност од 23.1 ± 0.1 μM) што овај рад такође чини компарибилним са нашим.

Прегледом доступле литературе долазимо до рада у коме су *Jacqueline Gamboa Varela* и сарадници синтетизовали два цис-дихлоридплатинум (II) једињења (13 и 14) која су састављена од мета- и пара-Н, Н-дифенил пиридинаминских лиганда (170). Они су ефекат ова два једињења на исти начин пратили на ћелијској линији MDA MB-231 а ко контрола и је била цисплатина као код нас. Њихово истраживање се заснивало на 24-часовном третману новим комплексима. IC₅₀ вредности измерене на њиховим једињењима 13 и 14 износе 7.5 ± 1.3 μM односно 1 ± 0.3 μM . Ови резултати у поређењу са нашим су приближни

када је комплекс K1 у питању ($8.8 \pm 1.0 \mu\text{M}$) а далеко бољи од комплекса K2. Запажамо и да њихов комплекс 14 има бољу ефикасност од нашег комплекса K1.

Поред горе наведене третирали смо и мишју културу ћелија карцинома дојке (4T1). Анализом IC_{50} вредности којима је третирана 4T1 линија добили смо следеће резултате: K1 комплекс након 24 часа инкубације значајно боље делује на ове ћелије од K2, цисплатине и оксалаплатине има вредност IC_{50} $8.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$. Са поратсом дужине третмана на 48 сати односно 72 сата мерена IC_{50} вредност благо опада 8.7 ± 0.6 , па $6.9 \pm 1.2 \mu\text{M}$. Вредности IC_{50} комплекса K2 након 24, 48 односно 72 сата износе >500 , 190.4 ± 10 и $151.3 \pm 9.6 \mu\text{M}$. Ови резултати показују да је K1 комплекс знатно ефикаснији од K2 комплекса у свим интервалима деловања. Даље, вредности IC_{50} цисплатине након 24, 48 односно 72 сата износе 154.8 ± 12.4 , 58.1 ± 4.0 и $2.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$. Анализом резултата након третмана оксалаплатином и добили следеће IC_{50} вредности за 24, 48 односно 72 сата третмана: 179.3 ± 10.2 , 47.6 ± 3.2 , $2.1 \pm 0.9 \mu\text{M}$. Као што ј је наведено код свих супстанци којима смо третирали 4T1 ћелијску линију постоји временска зависност у различитој мери и како дужина третмана расте опада IC_{50} вредност. Посебно је значајна чињеница да K1 комплекс већ након 24 сата деловања остварује далеко боље резултате од осталих коришћених једињења.

И ове резултате смо упоредили са онима из доступне литературе. *Iwona Lakomska* и сарадници си синтетисали серију комплекса динуклеарне платине са малонатом и своје резултате објавили у раду (171). Они су налик нашем истраживању синтетисали, а потом пратили цитотоксични ефекат тих комплекса на 4T1 ћелиској линији. Као контролу и они су користили цисплатину. Увидом у њихове резултате уочавамо да IC_{50} вредности након 72 сата инкубације комплексима 1, 2 и 3 износе: немерљиво, 45.06 ± 3.41 и $5.27 \pm 1.21 \mu\text{M}$. Ове податке споредимо са нашим K1 и K2 комплексима 6.9 ± 1.2 и $151.3 \pm 9.6 \mu\text{M}$. Ови резултати показују да у поређењу са нашим комплекси 1, 2 и 3 из поменутог рада имају бољу ефикасност од нашег K1 а комплекси 1 и 2 имају лошију ефикасност од нашег K1. Комплекс 3 има приближну ефикасност нашем K1 комплексу. Наши резултати IC_{50} вредности платине на 4T1 линију износе $2.7 \pm 0.4 \mu\text{M}$ и у потпуности су компарибилни са резултатима из овог рада. *Kamil Hoffmann* и сарадници су у свом раду синтетисали шест нових платинастих (II) комплекса који садрже пурин-миметичке лиганде и њихову

цитотоксичност испитивали на 4T1 линији у трајању од 72 сата (172). Анализом њихових резултата долазимо до закључка наш комплекс K2 има далеко лошију ефикасност од већине из њихове палете. Са друге стране наш K1 комплекс и његова IC₅₀ вредност 6.9±1.2 μM је од 4 комплекса далеко боља а ањприближнија два су са IC₅₀ вредностима 5.3± 1.2 и 3.5±0.7 μM. IC₅₀ вредност цисплатине која је коришћена у овом раду је такође компарабилна са нашим резултатима и износи 9.7± 2.5 μM. *Bata Konovalov* и сарадници су у овом објављеном раду синтетисали 7 комплекса (обележених бројевима 1-7 који се разликују у лиганду L) платине којима су третирани 4T1 ћелијску линију (173). Упоредивши вредности IC₅₀ њихових комплекса са нашим дошли смо до следећих закључака. Оба комплекса K1 и K2 показују бољу ефикасност него серија од 7 горе наведених синтетисаних комплекса. Једино њихов синтетисани комплекс 1 има вредност нижу од нашег K2 (151.3±9.6 μM) и износи 64.5 ± 9 μM што и даље претставља далеко вишу вредност од K1 (6.9±1.2). У овом раду је коришћена цисплатина као контрола. Остале вредности IC₅₀ су се кретале од 185-523 μM.

Poulomi Sengupta, и сарадници су у свом раду синтетисали комплекс платине (II) који је везан са холестеролом и своја истраживања су вршили на 4T1 ћелијској линији као и ми (174). Они су објавили рад у коме је IC₅₀ вредност њиховог комплекса према 4T1 ћелијској линији 0.44 ± 0.016 μM што је боља ефикасност у односу на наше K1 и K2 комплексе али и у односу на цисплатину која је у овом раду коришћена као контрола.

Један од критеријума који би требало да испуни супстанца која претендује да постане хемиотерапеутик је потпуно одсуство или низак ниво цитотоксичности на здраве, малигно неизмењене ћелије. Стога је предмет нашег даљег истраживања ефикасности динуклераниох комплекса платине K1 и K2 био испитивање утицаја на здраве фибробласте MRC-5 линије. Анализом смањења броја вијабилних ћелија након третмана комплексима добили смо следеће резултате: K1 комплекс након 24 часа инкубације има вредност IC₅₀ 107.1±6.3 μM. Након 48 сати односно 72 сата мерена IC₅₀ вредност благо опада 114.8±6.3, па 121±4.7 μM. Вредности IC₅₀ комплекса K2 након 24, 48 односно 72 сата износе >500, >500 и 401.0±17.6 μM. Дакле K2 комплекс слабо делује на здраве фибробласте. Даље, вредности IC₅₀ цисплатине након 24, 48 односно 72 сата износе 372.6±28.3, 101.7±6.9 и 39.4±2.5 μM. Исту ову ћелијску линију смо третирани и оксалплатином и добили следеће IC₅₀ вредности за 24, 48 односно 72 сата третмана:

268.3±17.9, 38.6±2.19, 11.6±1.3 μ M. Као што ј наведено код свих супстанци којима смо третирали MRC-5 ћелијску линију постоји временска зависност и како дужина третмана расте опада IC₅₀ вредност. Све ове резултате смо приказали и кроз индекс селективности где смо показали да на обе ћелијске линије тумора у пуном времену деловања K1 комплекс предњачи у висини индекса селективности (најселективнији је). Овај индекс селективности за MDA-MB-231 линију износи K1 (17.4), K2 (4.4), цисплатина (1.4), оксалплатина (4.3). На 4T1 линији износи K1 (15.5), K2 (2.7), цисплатина (14.6), оксалплатина (5.5).

Своје резултате смо упоредили са онима из доступне литературе. *Pavel Štarha* и сарадници у свом истраживању су синтетисали укупно 7 комплекса платине(II) (175). Они су своје комплексе испитивали у смислу цитотоксичности на канцерским али и здравим MRC-5. Анализом њихових вредности IC₅₀ и поређењем са нашим резултатима за 24 часа инкубације закључујемо да наш комплекс K1 има далеко већу IC₅₀ вредност у односу на све комплексе испитиване у овој студији. Вредности IC₅₀ и за комплекс K2 су веће него испитиване. У овој студији се као контрола користила цисплатина која је по њиховим резултатима имала IC₅₀ вредност од >50.0. Такође у раду *Gordana M. Rakić* и сарадници који су синтетисали укупно 5 транс-платина (IV) комплекса које су испитивали на карциномским и здравим ћелијама MRC-5. Када смо упоредили резултате видели смо да је њихов комплекс 1 и 2 токсичнији тј има мању IC₅₀ вредност у односу на нашу (176). Међутим комплекси 3,4 и 5 имају вишу IC₅₀ вредност што их чини мање токсичним нарочито у односу на K1 комплекс и његове горе наведене IC₅₀ вредности. И овај експеримент је компарбилан са нашим и као контролу је користио цисплатину.

Након што смо доказали да новосинтетисани комплекси K1 и K2 уз респектабилан ниво селективности убијају малигне ћелије више него здраве поставили смо питање који је то механизам њиховог деловања. Од раније је познато да за хомеостазу организма је потребан добар баланс, пролиферације, диференцијације и ћелијске смрти. Последње време у фокусу науке је баш ћелијска смрт и могућности њене модификације. Опште позната је чињеница да су поремећаји регулације апоптозе, молекуларни основ канцерогенезе са једне али и резистенције малигних ћелија на цитостатике са друге стране. Стога је апоптоза таргет за деловање већине хемиотерапеутика.¹⁰⁰ Теоретски

гледано идеалан лек би био онај који би могао да индукује апоптозу само код малигне ћелије.

Анализом наших резултата комплекси K1 и K2 смањују вијабилност малигнућ ћелија тако што индукују апоптозу. У нашим резултатима на MDA-MB-231 линији K1 комплекс изазива апоптозу и то касну у $20.50 \pm$ % односно рану у $27.00 \pm$ %. Са друге стране комплекс K2 доводи до касне апоптозе у $18 \pm$ % случајева а $25.00 \pm$ % ћелија се налазило у раној апоптози. Дакле на (MDA-MB-231) линији оба комплекса фаворизују рану апоптозу. Комплекс K1 на мишјој 4T1 линији такође изазива апоптозу и то касну у 7.80 ± 0.50 % односно рану у 3.50 ± 1.50 %. На истој овој култури комплекс K2 доводи до касне апоптозе у 33.50 ± 1.20 % случајева а 8.60 ± 0.90 % ћелија се налазило у раној апоптози. Као што видимо на овој ћелијској линији комплекси делују различито. K1 фаворизује рану а K2 касну апоптозу. Слично нашим резултатима и други аутори који су пратили цитотокичност различитих комплекса платине као што је *Emma Bauer* и сарадници, *Rong Huang* и сарадници и већина упоређених радова, долазе до истог закључка да је механизам дејстава апоптоза. Анализирајући раније цитиране радове који се односе на комплексе против 4T1 ћелијске линије долазимо до истог закључка.

Да бисмо прецизније дали одговор на питање којим механизмом комплекси платине (II) K1 и K2 индукују апоптозу (MDA-MB-231) ћелија, даље смо имали за циљ да закључимо како ови комплекси делују на кључне ензиме програмиране ћелијске смрти (Вах, Bcl-2 активне каспазе-3). Наши су показали да комплекси платине након инкубације са овом ћелијском линијом имају следеће вредности MFI (mean fluorescence intensity) за Вах: K1 (262.5), K2 (187.1), цисплатина (234.8), контрола (178.4) и резултати иду у прилог повећању нивоа експресије проапоптотичког протеина Вах. Исти ови резултати на антиапоптотски Bcl-2 су следећи: K1 има вредност 106.3, комплекс K2 144.3 а цисплатина 163.4 што у поређењу са контролом 168 даје закључак да оба комплекса смањују интензитет флуоресценције односно експресије и активације антиапоптотског Bcl-2 протеина. Већ смо показали да комплекс K1 у односу на цисплатину има бољи ефекат него K2. Поремећај односа Вах протеина и Bcl-2 протеина апоптозе у смислу смањења Bcl-2/Вах односа настао као последица дејства K1 комплекса поново израженије од цисплатине и K2. И ово је још један од доказа да ови комплекси делују тако што активирају унутрашњи, митохондријалног пута апоптозе (177). У прилог овој тврдњи иду

наши резултати који доказују да повећан ниво активираних каспазе 3 настаје као последица дејства K1 и K1 израженије него цисплатина. У својим резултатима *Boulikas* и сарадници али и *Gornowicz* и сарадници показују да су наши резултати у складу са ранијим резултатима из литературе и да платина(II) као хемиотрапеутик делује преко унутрашњег пута апоптозе (178, 179).

Смањење броја вијабилних ћелија након третмана малигнућих ћелија је настало као резултат активирања апоптозе или заустављања процеса пролиферације у некој од фаза ћелијског циклуса, или се ради о комбинацији ова два механизма. Зато смо у даљем нашем истраживању анализирали фазе ћелијског циклуса у којој се нагомилавају ћелије након инкубације са комплексом K1 и K2. Анализом ћелијског циклуса ћелијске културе (MDA-MB-231) линија третирана комплексом K1 је према резултатима у G_0/G_1 фази имала 49.10% ћелија, у S фази се налази 14.50% а G_2/M 36.40% што представља пораст броја ћелија у G_2/M фази у односу на нетретирану групу. Дакле комплекс K1 зауставља ћелијску линију (MDA-MB-231) у G_2/M фази ћелијског циклуса а комплекс K2 у G_0/G_1 фази где се налази 61.70% ћелија и то је значајан пораст броја ћелија у односу на нетретирану групу. У S фази се налазило 12.40% а у G_2/M фази 25.90%. Анализом ћелијског циклуса на 4T1 ћелијској линији добили смо истоветне резултате K1 комплекс задржава ћелијски циклус у G_2/M фази K2 комплекс у G_0/G_1 фази. Кад своје податке упоредимо са онима из доступне литературе видимо да рецимо *Emma Bauer* и сарадници и сарадници налазе да након 72 сата инкубације са њиховим комплексом ћелијски циклус се задржава у S фази што су подаци који се разликују од наших. У другој студији пак, *Czarnomysu* и сарадници својим комплексима платине показују да њихови комплекси смањују проценат ћелија у G_0/G_1 фази а повећавају број ћелија у G_2/M и нешто мање у S фази што је компарабилно са нашим K1 комплексом (180). Заустављање ћелијског циклуса у G_2/M су добили као резултат и *Rimoldi* и сарадници у свом раду (181).

Различити типови тумора на молекуларном нивоу различито реагују на комплексе платине активирањем процеса апоптозе на различите начине. Неопходна су даља израживања у овом пољу ради евентуалног разјашњења недоумица у смислу разумевања молекуларних механизма антитуморског ефекта деривата платине.

6. Закључци

Резултати добијени нашим истраживањем наводе нас да извучемо следеће закључке:

1. Комплекси платине (II) који су за потребе овог истраживања синтетисани показују већу цитотоксичност 4T1 и MDA-MB-231 у односу на контролу. Ниво цитотоксичности је временски и дозно зависан.
2. Мањи је ниво цитотоксичности према фибробластима (MRC- 5), повећана је селективност.
3. Комплекси платине (II) који су за потребе овог истраживања синтетисани на ћелијске линије (4T1 и MDA-MB-231) делују тако што сањују способност преживљавања (вијабилност), индукцијом апоптозе.
4. Комплекси платине (II) који су за потребе овог истраживања синтетисани заустављају ћелијски циклус у појединим фазама. Ова чињеница може представљати додатни узрок смањења вијабилности ћелија.
5. Комплекси платине (II) који су за потребе овог истраживања синтетисани у ћелијама које су третиране индукују унутрашњи (митохондријални) пут апоптозе увећавајући ниво релативног односа Bcl-2/Bax али и активирањем ензима каспазе 3 (посредством цитохрома c).

7. Лутерамыра

1. Medicinska enciklopedija: Jugoslavenski leksikografski zavod Zagreb, 1967.
2. Džodić R. Anatomija dojke i pazušne jame. Hirurgija raka dojke. Beograd, Dosije, 2005; 7- 21.
3. Radojević S. Sistematska topografska anatomija, grudni koš. Naučna knjiga, Beograd 1970, pp. 236-241.
4. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer*. 2013;13:18.
5. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. *Redox Biol*. 2017;12:833-842.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Data status, Beograd. 2005.
7. Chial, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*. 2008;1(1):33.
8. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(10):a003236.
9. Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2002.
10. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harisonova načela interne medicine. Bard-Fin, Romanov. 2004.
11. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. 2015;9(6):XE01-XE05.
12. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009; 23:537–548
13. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2nd ed., Garland Science, New York and London, 2014.
14. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40

- countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403.
15. Pekmezović T. Epidemiologija raka dojke. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013.s.5-7
 16. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011.
 17. Miljuš D, Živković S, Božić Z. Incidencija i mortalitet raka u centralnoj Srbiji. Registar za rak u centralnoj Srbiji. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr. Milan Jovanović - Batut“, Beograd, 2014.
 18. Filipović S, Filipović A, Stojiljković V, Mišić I, Verbić S, Pejčić I, Stanojević Z. Breast cancer – clinical implication. *JMB*. 2007; 26(2): 134-143.
 19. Newman S, Miller A, Howe R. A study of the effect of weight and dietary fat on breast cancer survival time *am. J. Epidemiol*. 1986; 123 (5): 767-774.
 20. Solis P, Nuñez M, González C, Olivares A, Rojas A. Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. *Cancer Cell Int*. 2016; 16: 7-24.
 21. Etique N, Chardard D, Chesnel A, Merlin JL, Flament S, Grillier-Vuissoz I. Ethanol stimulates proliferation, ERalpha and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2004; 13(1): 149-155.
 22. Land C. Radiation and breast cancer risk. *Prog Clin Biol Res*. 1997; 396: 115-124.
 23. Boice J, Harvey E, Blettner M, Stovall M, Flannery J. Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 1992; 326(12): 781-785.
 24. Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, Aretini P, Bonatti F, Brunetti I, Bruno M, Lombardi G, Schittulli F, Sensi E. Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Ann Oncol*. 2004; 15: I7-13.
 25. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*. 2001; 477(1-2): 7-21
 26. Jurišić V, Živančević-Simonović S. U: Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2002, pp. 463-485.
 27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.

28. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 87.
29. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet.* 2001; 7: 677-685.
30. Warburg O. *The Prime Cause and Prevention of Cancer.* Lindau, Lake Constance, Germany, 1966.
31. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353-364.
32. Katić V, Kutlešić Č, Stojanović D, Petrović S, Dimov D, Tasić D, Gligorijević J, Mihailović D, Živković V, Jovičić-Milentijević M. *Opšta patologija, udžbenik za studente medicine i stomatologije.* Prosveta, Niš, 1996.
33. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(23): 3853-3868.
34. Krivokapić V. *Karcinom rektuma.* Izdavač: Zavod za udžbenike Beograd, 2012. ISBN: 97817-17967-8.
35. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406: 747-752.
36. Nocera N, Lee C, De La Cruz L, Roseblit C, Czerniecki B. Restoring lost anti-HER-2 Th1 immunity in breast cancer: A crucial role for Th1 cytokines in therapy and prevention. *Front Pharmacol.* 2016; 7: 356.
37. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol.* 2000; 281:150-162.
38. Gagliato D, Jardim D, Marchesi M, Hortobagyi G. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(39): 64431-64446.
39. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194: 23-28.
40. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer.* 1954; 8: 1-12; Peto H, Roe F, Lee P, L. Levy L, Clack J. Cancer and aging in mice and men. *Brit J Cancer.* 1975; 32(4):411-426
41. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res.* 2001; 477(1-2): 7-21.

42. Tomlinson, I, Sasieni P, Bodmer W. How many mutations in a cancer? *Am J Pathol.* 2002; 160: 755-758. ; Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 177-183.
43. Clark, Amy S., and Susan M. Domchek. "Clinical management of hereditary breast cancer syndromes." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16.1 (2011): 17-25.
44. Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet.* 2002; 31: 33-36.
45. Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet.* 2002; 31: 33-36.)
46. Yang WT, Lam WW, Cheung H, Suen M, King WW, Metreweli C. Sonographic, magnetic resonance imaging, and mammographic assessments of preoperative size of breast cancer. *J Ultrasound Med.* 1997; 16(12): 791-797. 7).
47. Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, Hanna WM, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Olopade OI, Weber BL, McLennan J, Olivotto IA, Bégin LR, Narod SA. Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 2029-2034
48. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 295-312. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transition. *Journal of Cell Science.* 2012; 125: 4703-4711
49. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 1995; 11: 211-219.
50. Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell.* 1998; 9(9): 2545-2560

51. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D. Molecular Biology of the Cell. 6th, 2014 (5e 2008)
52. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999; 13(12):1501-1512.
53. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005; 23(36): 9408-9421
54. Pardee AB. A restriction point control for normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71: 1286-1290.
55. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1: 222-23
56. Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG Jr, Livingston DM. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell.* 1994; 78(1):161-172.
57. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnicka-Worms H. Cyclin A/Cdk2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 8420-8431.
58. Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene.* 1995; 10(2): 229-236.
59. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation.* 2003; 36(3): 165-175.
60. Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long term aggresome accumulation leads to dna damage, p53-dependent cell cycle arrest, and steric interference in mitosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2015; 290(46): 27986-28000.
61. Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16(3): 311-321
62. Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 4344-4349.

63. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). Gelman IH, Sudol M, eds. *Genes & Cancer*. 2010; 1(11): 1124-1131.
64. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003; 36(3): 165-175
65. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differ*. 2009; 16(1): 3-11
66. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 1995; 5(1): 21-26.
67. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death & Differentiation*. 2012; 19(5): 735-742.
68. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000; 157(5): 1415-1430
69. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*. 2009; 284(33): 21777-21781
70. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36(Pt 1): 1-9
71. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516
72. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*. 2013; 14(1): 32
73. John Mendelson, Chapter 14: Apoptosis, Necrosis and Autophagy, *The molecular basis of cancer*, 4th Edition
74. Orvig C, Abrams MJ. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev* 1999; 99: 2201-3.
75. Kostova I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2006; 1(1): 1-22.
76. Sadler PJ, Li H, Sun H. Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coord Chem Rev* 1999; 185-186: 689-709.

77. Kaim, W, Schwederski, B. Bioinorganic chemistry: Inorganic element in the chemistry of life, Wiley: Stuttgart, 1993; 363-384.
78. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 1965; 205: 698-699.
79. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds - a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969; 222: 385-386.
80. Sakurai H, Kojima Y, Yoshikawa Y, Kawabe K, Yasui H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coord Chem Rev*. 2002; 226: 187-198.
81. Li H, Sun H. Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. *Curr Opin Chem Biol*. 2012; 16(1-2): 74-83.
82. Ali H, van Lier JE. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem Rev*. 1999; 99: 2379-2450.
83. Louie AY, Meade TJ. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem Rev*. 1999; 99: 2711-2734.
84. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev*. 1999; 99: 2269-2292.
85. Grunicke H, Doppler W, Helliger W, Hermann BJ, Hofmann J, Lindner H, Puschendorf B. Tumor biochemistry as basis for advances in tumor chemotherapy. *Arch Geschwulstforsch*. 1986; 56(3): 193-201.
86. Grunicke H, Doppler W, Helliger W, Hermann BJ, Hofmann J, Lindner H, Puschendorf B. Tumor biochemistry as basis for advances in tumor chemotherapy. *Arch Geschwulstforsch*. 1986; 56(3): 193-201.
87. Kauffman G. Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Rev*. 2010; 54(4): 250.
88. Rosenberg B, Van Camp L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Res*. 1970; 30: 1799-1802.
89. Kociba R, Sleight SD, Rosenberg B. Inhibition of Dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with cisdiamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother. Rep*. 1970; 54: 325-328.
90. Galanski M. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006; 1: 285-295.

91. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008; 6(1): 1-18.
92. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park).* 2009; 23(6): 488-496.
93. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2467-98.
94. Yang XL, Wang AH. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther.* 1999; 83(3): 181-215.
95. Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler BK. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev.* 2006; 106: 2224-2248
96. Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1806: 172-182.
97. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry.* 1985; 24(3): 707-713.
98. Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis[Pt(NH₃)₂(N⁷-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl]₂⁺-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(25): 5846-5851.
99. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3): 645-662.
100. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4): 307-2.
101. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52(12): 1855-1865.
102. Armand JP, Bolgie V, Raymond E, Fizazi K, Faivre S, Ducreux, M. Oxaliplatin in colorectal cancer: an overview. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 96-104.

103. Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin. Oncol.* 2002; 29: 11-20.
104. Alberto EM, Lucas MFA, Pavelka M, Russo N. The second generation anticancer drug nedaplatin: a theoretical investigation on the hydrolysis mechanism. *J Phys Chem B.* 2009; 113: 14473-14479.
105. Van Meerten E, Eskens FA, van Gameren EC, Doorn L, van der Gaast A. First-line treatment with oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced or metastatic oesophageal cancer: a phase II study. *Br J Cancer.* 2007; 96: 1348–1352.
106. Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: Novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 2075-2094.
107. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010; 39:8113-8127.
108. Nafees M, Zijian G. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current opinion in chemical biology.* 2014; 19: 144-153.
109. Hamilton G, Olszewski U. Picoplatin pharmacokinetics and chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Drug Evaluations.* 2013; 9 (10): 1381-1390.
110. Welink J, Boven E, Ver morken JB, Gall HE, Vijgh WJF. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2349-2358.
111. Lee JW, Park JK, Lee SH, Kim SY, Cho YB, Kuh HJ. Antitumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs.* 2006; 17: 377-384.
112. Kelland L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues, Satraplatin and picoplatin. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2007; 16: 1009-1021.
113. McCutcheon S, Cardoso F. Challenges in optimizing care in advanced BC patients: results of an international survey linked to the ABC1 consensus conference. *Breast.* 2015; 24: 623-629.

114. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2011; 16(Suppl 1): 61-70.
115. Porter K, Rosenzweig MQ. Current and Emerging Therapies for HER2-Positive Women With Metastatic Breast Cancer. *J Adv Pract Oncol*. 2017; 8(2):164-168.
116. Kolaric K, Roth A. Phase II clinical trial of cis-dichlorodiammine platinum (cis-DDP) for antitumorogenic activity in previously untreated patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1983; 11: 108-112.
117. Sledge Jr GW, Loehrer PJ, Sr BJ, Roth LH. Cisplatin as firstline therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1988; 6: 1811-1814.
118. Yap HY, Salem P, Hortobagyi GN, Bodey GP Sr, Buzdar AU, Tashima CK, Blumenschein GR. Phase II study of cis-dichlorodi - a mineplatinum(ii) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rep*. 1978; 62: 405-408.
119. Ostrow S, Egorin M, Aisner J, Bachur N, Wiernik PH. High-dose cis-diamminedichloroplatinum therapy in patients with advanced breast cancer: pharmacokinetics, toxicity, and therapeutic efficacy. *Cancer Clin Trials*. 1980; 3: 23-27.
120. Forastiere AA, Hakes TB, Wittes JT, Wittes RE. Cisplatin in the treatment of metastatic breast carcinoma: a prospective randomized trial of two dosage schedules. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 243-247.
121. Martino S, Samal BA, Singhakowinta A, Yoshida S, Mackenzie M, Jain J, Vaitkevicius VK: A phase II study of cis-diamminedichloroplatinum II for advanced breast cancer. Two dose schedules. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1984; 108: 354-356.
122. Bajorin D, Bosl GJ, Fein R. Phase I trial of escalating doses of cisplatin in hypertonic saline. *J Clin Oncol*. 1987; 5: 1589-1593.
123. Ramnath N, LoRusso P, Simon M, Martino S. Phase II evaluation of cisplatin and WR2721 for refractory metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1997; 20: 368-372.
124. Shamseddine AI, Farhat FS. Platinum-based compounds for the treatment of metastatic breast cancer. *Chemotherapy*. 2011; 57(6): 468-487.
125. Frasci G, Comella P, D'Aiuto G, Budillon A, Barbarulo D, Thomas R, Capasso I, Casaretti R, Daponte A, Caponigro F, Gravina A, Maiorino L, Carateni G, Gentile A, Comella G. Weekly paclitaxel-cisplatin administration with G-CSF support in advanced breast cancer. A phase II study. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 49: 13-26.

126. Hsu C, Huang CS, Chao TY, Lu YS, Bu CF, Chen MM, Chang KJ, Cheng AL. Phase II trial combining paclitaxel with 24-hour infusion cisplatin for chemotherapy-naive patients with locally advanced or metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2002; 95: 2044- 2050.
127. Maiche AG, Jekunen AP, Kaleva-Kerola J, Blanco Sequeiros G. High response rate with a lower dose of paclitaxel in combination with cisplatin in heavily pretreated patients with advanced breast carcinoma. *Cancer*. 2000; 88: 1863-1868.
128. Rosati G, Riccardi F, Tucci A, De Rosa P, Pacilio G. A phase II study of paclitaxel/cisplatin combination in patients with metastatic breast cancer refractory to anthracyclinebased chemotherapy. *Tumori*. 2000; 86: 207-210.
129. Ray-Coquard I, Biron P, Bachelot T, Guastalla JP, Catimel G, Merrouche Y, Droz JP, Chauvin F, Blay JY. Vinorelbine and cisplatin (CIVIC regimen) for the treatment of metastatic breast carcinoma after failure of anthracycline- and/or paclitaxel-containing regimens. *Cancer*. 1998; 82: 134-140.
130. Shamseddine AI, Taher A, Dabaja B, Dandashi A, Salem Z, El Saghir NS. Combination cisplatin-vinorelbine for relapsed and chemotherapy-pretreated metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1999; 22: 298-302.
131. Gunel N, Akcali Z, Yamac D, Onuk E, Yilmaz E, Bayram O, Tekin E, Coskun U. Cisplatin plus vinorelbine as a salvage regimen in refractory breast cancer. *Tumori*. 2000; 86: 283-285.
132. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1994; 9: 1829-1838.
133. Arteaga CL, Winnier AR, Poirier MC, Lopez- Larraza DM, Shawver LK, Hurd SD, Stewart SJ. p185c-erbB-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: Association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and druginduced DNA repair. *Cancer Res*. 1994; 54: 3758-3765.
134. Nabholz JM, Slamon D. New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (herceptin). *Semin Oncol*. 2001; 28: 1-12.

135. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2011; 364: 205-214.
136. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010; 376: 235-244.
137. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 17079–17084.
138. Evers B, Drost R, Schut E, de Bruin M, van der Burg E, Derksen PW, Holstege H, Liu X, van Drunen E, Beverloo HB, Smith GC, Martin NM, Lau A, O'Connor MJ, Jonkers J. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 3916-3925.
139. S. U. Milinković, T. N. Parac, M. I. Djuran, N. M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1997, 16, 2771–2776.
140. H. Hohmann, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta* 1990, 74, 87–92.
141. M. D. Živković, D. P. Ašanin, S. Rajković, M. I. Djuran, *Polyhedron* 2011, 30(6), 947–952.
142. Rajković S, Ašanin DP, Živković MD, Djuran MI. Synthesis of different pyrazine-bridged platinum(II) complexes and ¹H NMR study of their catalytic abilities in the hydrolysis of the N-acetylated L-methionylglycine. *Polyhedron* 2016;65:42–47.
143. Rajković S, Rychlewska U, Warzajtis B, Ašanin DP, Živković MD, Djuran MI. Disparate behavior of pyrazine and pyridazine platinum(II) dimers in the hydrolysis of histidine- and methionine-containing peptides and unique crystal structure of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ with a pair of NH...Cl – ...HN hydrogen bonds supporting the pyridazine bridge. *Polyhedron* 2014;67:279–285.

144. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
145. Чановић, П. (2017). *Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије in vitro*. Докторска дисертација, Крагујевац: Факултет медицинских наука у Крагујевцу.
146. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1): 39-51.
147. Shirali S, Aghaei M, Shabani M, Fathi M, Sohrabi M, Moeinifard M. Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tumor Biology*. 2013; 34(2):1085-1095.
148. Cicala C, Arthos J, Rubbert A, Selig S, Wildt K, Cohen OJ, Fauci AS. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1178-83.
149. Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. *Cell Death Differ*. 2003;10(7):853-5.
150. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, et al., Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003;101(6):2125-31.
151. J. -A. Zhang, M. Pan, J. -Y. Zhang, H. -K. Zhang, Z. -J. Fan, B. -S. Kang, C. -Y. Su, *Polyhedron* 2009,28(1), 145–149.
152. S. Chattopadhyay, P. Chakraborty, M. G. B. Drew, A. Ghosh, *Inorg. Chim. Acta*2009, 362, 502–508.
153. K. N. Lazarou, I. Chadjistamatis, A. Terzis, S. P. Perlepes, C. P. Raptopoulou, *Polyhedron*2009,29(7), 1870–1879.
154. B. Konovalov, M. D. Živković, J. Z. Milovanović, D. B. Djordjević, A. N. Arsenijević, I. R. Vasić, G. V. Janjić, A. Franich, D. Manojlović, S. Skrivanj, M. Z. Milovanović, M. I. Djuran, S. Rajković, *Dalton Trans*.2018, 47, 15091-15102.
155. D. P. Ašanin, M. D. Živković, S. Rajković, B. Warżajtis, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Polyhedron*2013, 51, 255–262.

156. <http://globocan.iarc.fr/>
157. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer*. 2013;13:18.
158. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000;21(6):167-223.
159. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
160. Katić V, Kutlešević C, Stojanović D. Opšta patologija: udžbenik za studente medicine i stomatologije. Prosveta, Niš. 1997.
161. Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2002.
162. Weiss RB, Christian MC. New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs*. 1993 Sep;46(3):360-377.
163. Ho GY, Woodward N, Coward JJ. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;102:37-46.
164. O'Dwyer PJ, Johnson SW. Current status of oxaliplatin in colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2003;30(3 Suppl 6):78-87.
165. Jacobs SS, Fox E, Dennie C, Morgan LB, McCully CL, Balis FM. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin in nonhuman primates. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1669-74.
166. Goodsell DS. The molecular perspective: cisplatin. *Oncologist*. 2006;11(3):316-7.
167. Bauer, Emma, et al. "Synthesis, characterization and biological activity of new cyclometallated platinum (iv) iodido complexes." *Dalton Transactions* 46.43 (2017): 14973-14987.
168. Czarnomysy, Robert, et al. "Biological evaluation of dimethylpyridine–platinum complexes with potent antiproliferative activity." *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31.sup3 (2016): 150-165.
169. Huang, Rong, et al. "Biological evaluation of a novel Herceptin-platinum (II) conjugate for efficient and cancer cell specific delivery." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 73 (2015): 116-122

170. Varela, Jacqueline Gamboa, et al. "Synthesis, characterization, and evaluation of cis-diphenyl pyridineamine platinum (II) complexes as potential anti-breast cancer agents." *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19.6 (2014): 967-979.
171. Łakomska, Iwona, et al. "Cytotoxic malonate platinum (II) complexes with 1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidine derivatives: Structural characterization and mechanism of the suppression of tumor cell growth." *Journal of inorganic biochemistry* 141 (2014): 188-197.
172. Hoffmann, Kamil, et al. "Rational design of dicarboxylato platinum (II) complexes with purine-mimetic ligands as novel anticancer agents." *Journal of inorganic biochemistry* 172 (2017): 34-45.
173. Konovalov, Bata, et al. "Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum (ii) complexes with an aromatic 1, 5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum (ii) complexes in relation to the complex structure." *Dalton Transactions* 47.42 (2018): 15091-15102.
174. Sengupta, Poulomi, et al. "Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.28 (2012): 11294-11299.
175. Štarha, Pavel, et al. "Platinum (II) carboxylato complexes containing 7-azaindoles as N-donor carrier ligands showed cytotoxicity against cancer cell lines." *Journal of inorganic biochemistry* 162 (2016): 109-116.
176. Rakić, Gordana M., et al. "The synthesis, spectroscopic, X-ray characterization and in vitro cytotoxic testing results of activity of five new trans-platinum (IV) complexes with functionalized pyridines." *European journal of medicinal chemistry* 55 (2012): 214-219.
177. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C45-51.
178. Boulikas, Teni, and Maria Vougiouka. "Cisplatin and platinum drugs at the molecular level." *Oncology reports* 10.6 (2003): 1663-1682.
179. Gornowicz, Agnieszka, et al. "Mechanism of anticancer action of novel berenil complex of platinum (II) combined with anti-MUC1 in MCF-7 breast cancer cells." *Oncology letters* 15.2 (2018): 2340-2348.

180. Czarnomysy, Robert, et al. "A novel series of pyrazole-platinum (II) complexes as potential anti-cancer agents that induce cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells." *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 33.1 (2018): 1006-1023.
181. Rimoldi, Isabella, et al. "In vitro anticancer activity evaluation of new cationic platinum (II) complexes based on imidazole moiety." *Bioorganic & medicinal chemistry* 25.6 (2017): 1907-1913.

БИОГРАФИЈА

Доктор Ненад В. Марковић је рођен 22.07.1984. у Крагујевцу. Основну и средњу медицинску школу у Крагујевцу је завршио као носилац дипломе Вук Караџић. Уписао Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2003/04 године. Дипломирао на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 2010 године. По дипломирању завршио лекарски стаж и положио стручни испит. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписао школске 2011/2012 на смеру Клиничка и експериментална хирургија. Усмени докторски испит положио 2013. године. Новембра 2018. године пријавио тему докторске дисертацијена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Ангажован као сарадник у настави на Катедри за Анатомију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу 2012-2014 године. Као фацилитатор у настави на предмету Хирургија Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу 2016, а затим од 2017. године и даље у звању истраживач приправник на Катедри за Хирургију. Од 2014. Године у радном односу на Клиници за општу и грудну хирургију Клиничког центра у Крагујевцу. Специјализант је завршне године из области абдоминалне хирургије. Члан је српског лекарског друштва, панкреасног клуба и Удружења ендоскопских хирурга Србије. Говори течно енглески језик и има висок ниво знања рада на рачунару.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Marković, N.**, Zarić, M., Živković, M. D., Rajković, S., Jovanović, I., Arsenijević, N., ... & Ninković, S. (2019). Novel Platinum (II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells In Vitro. *ChemistrySelect*, 4(44), 12971-12977.
2. Milan M. Zarić, Petar P. Čanović, Marijana Stanojević Pirković, Sanja M. Knežević Rangelov, Radica S. Živković Zarić, Biljana Popovska Jovičić, Nedim Hamzagić, Bojana Simović Marković, **Nenad Marković**, Ana Rilak Simović. NEW GOLD PINCER-TYPE COMPLEXES INDUCE CASPASE-DEPENDENT APOPTOSIS IN HUMAN CANCER CELLS IN VITRO. *Vojnosanitetski pregled*.
3. **Markovic, N.**, Lukovic, A., Arsenijevic, N., Ninkovic, S., & Ljubic, B. (2018). The Role of Tumor Microenvironment and Impact of Cancer Stem Cells on Breast Cancer Progression and Growth. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*.
4. Spasic, M., Milosevic, B., Mitrovic, S., **Markovic, N.**, Pavlovic, M., Jevdjic, J., ... & Kozomara, Z. (2018). A Giant Exulcerated Phyllodes Breast Tumor-A Case Report. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*.
5. Milosevic, B., **Markovic, N.**, Markovic, R., Cvetkovic, A., Stojanovic, B., Radovanovic, D., ... & Cvetkovic, D. (2019). Synchronous Manec (Mixedadeno-Neuroendocrine Carcinoma) of the Colon and Renal Cell Carcinoma—Case Report. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*.
6. Boskovic, M., Pavlovic, M., Radovanovic, D., Lazic, D., Milosevic, B., Stankovic, M., **Markovic, N.**, ... & Jovanovic, M. (2019). Mucocele of the Apendix—A Case Report and Review of the References. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. DOI: 10.2478/sjecr-2019-0062
7. Jovanović, J., Jeremić, D., Jovanović, B., Vulović, M., Sazdanović, P., Sazdanović, M., **Markovic, N.**, ... & Živanović-Mačužić, I. (2014). Nasal morphological characteristics of the Serbian population. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 227-232.
8. **Markovi, N.**, Ognjanović, N. (2014). FUNKCIONALNI I ANATOMSKI ASPEKTI HABENULARNOGKOMPLEKSA EPITALAMUSA. *Med Čas (Krag)* 2014; 48(3): 128-135,
9. Markovic R, BogojevicR, Spasic M, Milosevic B, Cvetkovic A, **Markovic N**. Surgical treatment of the pancreatic head cancer - our experience. 1^{0th} Congress of European-African HepatoPancreato Biliary Association. Belgrade, Serbia 2013. Abstract book: P360 (M34=0.5 бодова)
10. R. Markovic, B. Milosevic, A. Cvetkovic, **N. Markovic**, V. Stankovic and M. Spasic. Synchronous cancer of right colon and left kidney: Report of a case. 9th Biannual International Symposium of Coloproctology, Belgrade, Serbia 2014. Abstract book: P2,69(M34=0.5 бодова)

11. **Марковић Н.**, Ристић М. Онколошка терапија колоректалног карцинома. Зборник сажетака радова 50 конгреса студената биомедицинских наука Србије са интернационалним учешћем. Лепенски Вир, 2009. *Зборник сажетака доступан у електронском формату* М64=0,2 бода
12. **Марковић Н.**, Ристић М. Значај ендоскопске хемостазе у третману акутних крварећих лезија једњака, желуца и дуденума. Зборник сажетака радова 51. Конгреса студената биомедицинских наука Србије са интернационалним учешћем. Охрид, 2010; р 127 М64=0,2 бода
13. Др Раде Марковић, др Радисав Богојевић, др Александар Цветковић, др Бојан Милошевић, др Марко Спасић, **др Ненад Марковић**, Клиника за општу и грудну хирургију, Клинички центар Крагујевац. ПРЕВЕНЦИЈА ДЕХИСЦЕНЦИЈЕ ДУОДЕНУМА КОД *BILLROTH III* РЕСЕКЦИЈЕ ЖЕЛУЦА. Редовни састанак Хируршкесекције СЛД у организацији Клинике за општу и грудну хирургију КЦ Крагујевац. 30. Септембра 2016. године у Крагујевцу.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска публикација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Ненад В. Марковић

Ментор/коментор - МН: Проф. Др Срђан Нинковић; Доц. Др Милан Зарић

Наслов рада - НР: Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке *in vitro*

Језик публикације - ЈП: српски/ћирилица

Језик извода - ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Централна Србија

Година - ГО: 2020

Издавач - ИЗ: ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада - ФО: 128 страна, 21 табела, 23 графикана, 15 слика

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Клиничка и експериментална хирургија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: 4Т1, МДА-МВ-231, карцином дојке, динуклеарни комплекси платине(II), инфрацрвена и НМР спектроскопија, оксалиплатина, цисплатина

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена- МН:

Извод - ИД:

Увод: Рутинска примена до сада откривених препарата платине у онкологији има своје недостатке и ограничења, а то је њихово токсично дејство, ограничена растворљивост и појава резистенције након дуже примене. Да би се превазишли недостаци деривата платине, а посебно токсичност, синтетисан је велики број комплекса платине(II) као што су карбоплатина, оксалиплатина, недаплатина, лобаплатина и хептаплатина (4). Још већи помак је направљен синтезом комплекса који садрже два или више јона платине повезаних мостним лигандима, тзв. полинуклеарни комплекси платине али и они су имали извесна ограничења у примени.

Материјал и методе: Ова студија је спроведена по типу експерименталне студије на материјалу хуманог и анималног порекла *in vitro*. Синтетисали смо одговарајуће платина(II) комплексе, $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2$ и $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2$, где је 1,7-phen мостни лиганд 1,7-фенантролин, односно 4,7-фенантролин. Исте комплексе смо метадама елементарне микроанализе и спектроскопије окарактерисали. Антигуморски ефекат синтетисаних комплекса *in vitro* смо доказали МТТ тестом, анализом ћелија обојених Annexin-ом V и пропидијум јодидом, анализом молекула укључених у процес апоптозе (Вах, Bcl-2, каспаза-3) и анализом ћелијског циклуса.

Резултати: У нашем истраживању након што смо окарактерисали два комплекса K1 и K2 доказали смо да оба комплекса, нарочито K1 имају израженији цитотоксични ефекат на ћелијске линије карцинома дојке *in vitro* како хуманог тако и анималног порекла. Са друге стране наши резултати показују да ефекат ових комплекса на здраве фибробласте из линије MRC-5 је мање цитотоксичан у односу на конвенционалне хемиотерапеутике из групе деривата платине. Ова чињеница би могла бити претпоставка да би новосинтетисани лекови на бази динуклеарних комплекса платине били мање токсични а самим тим и безбеднији за рутинску примену.

Закључак: Динуклеарни комплекси платине(II) који су употребљени у овој тези су растворни у води и по структури слични оксалиплатини која се користи за лечење оболелих од карцинома дојке, а нарочито агресивних облика ове болести. Показали смо да новосинтетисани динуклеарни комплекси платине(II) показују израженији цитотоксични ефекат на ћелије карцинома дојке *in vitro* у поређењу са цисплатином и оксалиплатином. Овим експерименталним радом указали смо на нове динуклеарне комплексе платине(II)

који би се могли користити у наредним истраживањима у области координовања платине са лигандима од фармаколошког значаја.

Кључне речи: 4T1, MDA-MB-231, карцином дојке, динуклеарни комплекси платине(II), инфрацрвена и НМР спектроскопија, оксалиплатина, цисплатина

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 26.12.2018. године.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. **Доц. др Марија Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, председник
2. **Проф. др Наташа Петронијевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Медицинска и клиничка биохемија, члан
3. **Доц. др Марко Спасић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual printed material

Contents code - CC: Ph. D. Thesis

Author - AU: Nenad V. Markovic

Menthor/co-mentors - MN: Associate professor Srdjan Ninkovic, M.D. Ph.D. Assistant professor Milan Zaric, M.D. Ph.D.

Title - TI: Cytotoxicity of newly synthesized dinuclear platinum (II) complexes to breast cancer cells *in vitro*

Language of text - LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Central Serbia

Publication year - PY: 2020

Publisher - PU: Author reprint

Publication place - PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description - PD: 128 pages, 21 tables, 23 charts, 15 figures

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Clinical and experimental surgery

Subject/key words - SKW: 4T1, MDA-MB-231, breast cancer, dinuclear platinum (II) complexes, infrared and NMR spectroscopy, oxaliplatin, cisplatin

UDC

Holding data:Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note - N:

Abstract

Introduction: The routine use of platinum preparations discovered so far in oncology has its drawbacks and limitations, which is their toxic effect, limited solubility and the appearance of resistance after prolonged administration. To overcome the disadvantages of platinum derivatives, and in particular toxicity, a number of platinum (II) complexes such as carboplatin, oxaliplatin, nedaplatin, lobaplatin, and heptaplatin have been synthesized. A further shift was

made by the synthesis of complexes containing two or more platinum ions linked by bridge ligands, the so-called polynuclear platinum complexes but they also had some limitations in their application.

Material and Methods: This study was conducted by type of experimental study on material of human and animal origin *in vitro*. We synthesized the corresponding platinum (II) complexes, $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,7\text{-phen})](ClO_4)_2$ and $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-4,7\text{-phen})](ClO_4)_2$, where the 1,7-phen bridge ligand is 1,7-phenanthroline and 4,7-phenanthroline, respectively. We characterized the same complexes by the methods of elemental microanalysis and spectroscopy. The *in vitro* antitumor effect of the synthesized complexes was demonstrated by MTT assay, analysis of Annexin V and propidium iodide stained cells, analysis of molecules involved in apoptosis (Bax, Bcl-2, caspase-3) and cell cycle analysis.

Results: In our study, after characterizing the two K1 and K2 complexes, we demonstrated that both complexes, especially K1, have a more pronounced cytotoxic effect on breast cancer cell lines *in vitro* of both human and animal origin. On the other hand, our results show that the effect of these complexes on healthy MRC-5 fibroblasts is less cytotoxic than conventional platinum-derived chemotherapeutics. This fact might suggest that newly synthesized drugs based on dinuclear platinum complexes would be less toxic and therefore safer for routine use.

Conclusion: The dinuclear platinum (II) complexes used in this thesis are water-soluble and oxaliplatin-like in structure for the treatment of breast cancer patients, and in particular for aggressive forms of this disease. We have shown that the newly synthesized dinuclear platinum (II) complexes exhibit a more pronounced cytotoxic effect on breast cancer cells *in vitro* compared with cisplatin and oxaliplatin. Through this experimental work, we have identified novel dinuclear platinum (II) complexes that could be used in future studies in the field of platinum coordination with ligands of pharmacological importance.

Keywords: 4T1, MDA-MB-231, breast cancer, platinum (II) dinuclear complexes, infrared and NMR spectroscopy, oxaliplatin, cisplatin

Accepted by the Scientific Board on - ASB: December 26th 2018.

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:

1. Assistant professor Marija Zivkovic, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman
2. Full professor Natasa Petronijevic, M.D, Ph.D, Medical Faculty, University of Belgrade, member
3. Assistant professor Marko Spasic, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ненад, В. Марковић, изјављујем да докторска

дисертација под насловом:

Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке in vitro

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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 _____, 21.02.2020. године,


_____ потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ У ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ненад Марковић,

- дозвољавам
 не дозвољавам

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

Цитотоксичност новосинтетисаних динуклеарних комплекса платине(II) на ћелије карцинома дојке in vitro

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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 _____, 21.02.2020. 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/>

Medicinal Chemistry & Drug Discovery

Novel Platinum(II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells In Vitro

Nenad Marković,^[a] Milan Zarić,^[b] Marija D. Živković,^[c] Snežana Rajković,^[d] Ivan Jovanović,^[a] Nebojša Arsenijević,^[a] Petar Čanović,^[b] and Srđan Ninković^[a]

Two new dinuclear Pt(II) complexes with different aromatic nitrogen-containing heterocyclic compounds as the bridging ligands, $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-1,7\text{-phen})](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C1) and $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-4,7\text{-phen})](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C2), (1,7-phen and 4,7-phen are 1,7-phenanthroline and 4,7-phenanthroline while en is a bidentate coordinated ethylenediamine), were synthesized and structurally characterized by NMR (1H and ^{13}C), IR and UV-vis spectroscopy. *In vitro* cytotoxic activity of these complexes was

evaluated against two tumor cell lines, human breast carcinoma (MDA-MB-231) and mouse breast carcinoma cells (4T1), and against one type of healthy human fibroblasts cells (MRC-5). Platinum complex C1 showed stronger selectivity toward MDA-MB-231 and 4T1 breast carcinoma cells in comparison to cisplatin and oxaliplatin. Complex C2 displayed lower cytotoxicity than cisplatin and oxaliplatin in case of all stated cell lines, showing selectivity comparable to oxaliplatin.

Introduction

The most common type of cancer in women in the United States and worldwide is breast cancer.^[1] Various chemotherapeutics are currently being used in the therapy of breast cancer and this practice has contributed to decrease of breast cancer mortality.^[2,3] After the acceptance of cisplatin in the treatment of various types of cancer, the development of other platinum-based compounds has received great attention.^[4,5] However, despite the recent progress in discovering novel chemotherapeutics, patients with breast cancer in general, and especially patients with triple negative breast cancer, have poor clinical outcomes.^[6–8] Also, current therapeutic strategies for breast cancer treatment are limited due to serious side effects and drug resistance.^[9] Therefore, it is necessary to continuously develop novel chemotherapeutics in order to treat this type of cancer.

Deregulation in apoptotic cell death machinery is a main characteristic of cancer.^[10] Apoptosis is a process of cell degeneration that is not associated with inflammation and damage to surrounding healthy cells, and therefore a more favorable mechanism for reducing the number of tumor cells compared to necrosis.^[10,11] Consequently, it is important that novel candidates for chemotherapeutics decrease viability of tumor cells by induction of apoptosis.

Polynuclear platinum(II) complexes, in which two or three platinum centers are bridged by polyamines or different *N*-heterocycles, represent a novel class of antitumor agents.^[12] Earlier results of investigation showed that some of the dinuclear platinum(II) complexes with *N*-heterocycles bridging ligands are more effective *in vitro* than cisplatin in several tumor cell lines.^[13–16]

In this study we report synthesis and spectroscopic characterization of two new dinuclear platinum(II) complexes, $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-1,7\text{-phen})](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C1) and $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-4,7\text{-phen})](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C2), (en is a bidentate coordinated ethylenediamine, 1,7-phen and 4,7-phen are 1,7-phenanthroline and 4,7-phenanthroline). *In vitro* cytotoxic activities of these complexes have been tested on two tumor cell lines human breast carcinoma (MDA-MB-231) and mouse breast carcinoma cells (4T1), and against human fibroblasts cells (MRC-5).

Results and Discussion

Synthesis and structural characterization of dinuclear platinum(II) complexes C1 and C2

The complexes $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-1,7\text{-phen})](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C1) and $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-4,7\text{-phen})](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C2), in which 1,7-phen (1,7-phenanthroline) and 4,7-phen (4,7-phenanthroline) are bridging aromatic *N*-heterocyclic ligands, en (ethylenediamine)

- [a] N. Marković,* Dr. S. Ninković
University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Surgery, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
- [b] Dr. M. Zarić,* Dr. P. Čanović
University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
- [c] Dr. M. D. Živković
University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
E-mail: mzhivkovic@kg.ac.rs
- [d] Prof. S. Rajković
University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
- [e] Prof. I. Jovanović, Prof. N. Arsenijević
University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

[*] equal contribution

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/slct.201903290>

bidentate coordinated diamine ligand (Figure 1), have been synthesized and structurally characterized by elemental microanalyses, ^1H NMR, IR and UV-vis spectroscopy. These data are in accordance to the structure of the complex containing two equivalent square planar $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]^+$ units linked with 1,7-phen or 4,7-phen ligand.

NMR characterization. The ^1H NMR chemical shifts, as well as $\Delta(\delta^1\text{H})_{\text{coord}}$ coordination shifts for **C1** and **C2** determined in respect to those for the uncoordinated *N*-heterocycles are listed in Table 1.

In the aromatic region, the ^1H NMR spectra of **C1** complex consists of four characteristic group of signals corresponding to eight protons of the three condensed aromatic rings in *N*-heterocycle, with resonances shifted downfield in respect to those for the protons of the uncoordinated 1,7-phen ligand. The observed downfield shifting for the aromatic protons in the *N*-heterocyclic ligand after their platination can be ascribed to a delocalization of the charge deficiency (cation formation

by Pt(II) coordination) throughout all the rings in the molecule as anticipated.^[16,17] Considering all aromatic protons, the significant values of $\Delta(\delta^1\text{H})_{\text{coord}}$ coordination shifts are +0.18 and +0.72 ppm for **C1** complex.

The ^1H NMR spectra of **C2** complex consists of three characteristic group of signals corresponding to eight protons of the 4,7-phen ligand. Signals of free ligand in ^1H NMR spectra at 7.75 ppm which corresponds to C2H/C9H and singlet at 8.21 ppm for C5H/C6H in the spectra of **C2** give multiplet at 8.03 ppm. As it can be seen in Table 1, the resonances for all aromatic protons in **C2** are downfield shifted with respect to those for the uncoordinated 4,7-phen ligand ($\Delta(\delta^1\text{H})_{\text{coord}} = +0.18 - +0.89$).

UV-vis spectrophotometry: The UV-vis spectra of **C1–C3** in dmf/ H_2O (1:9, v/v) at a concentration of $5 \cdot 10^{-5}$ M are shown in Figure 2. The wavelengths of maximum absorption for these complexes (λ_{max} , nm) and molar extinction coefficients (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), determined right after dissolution of the complexes,

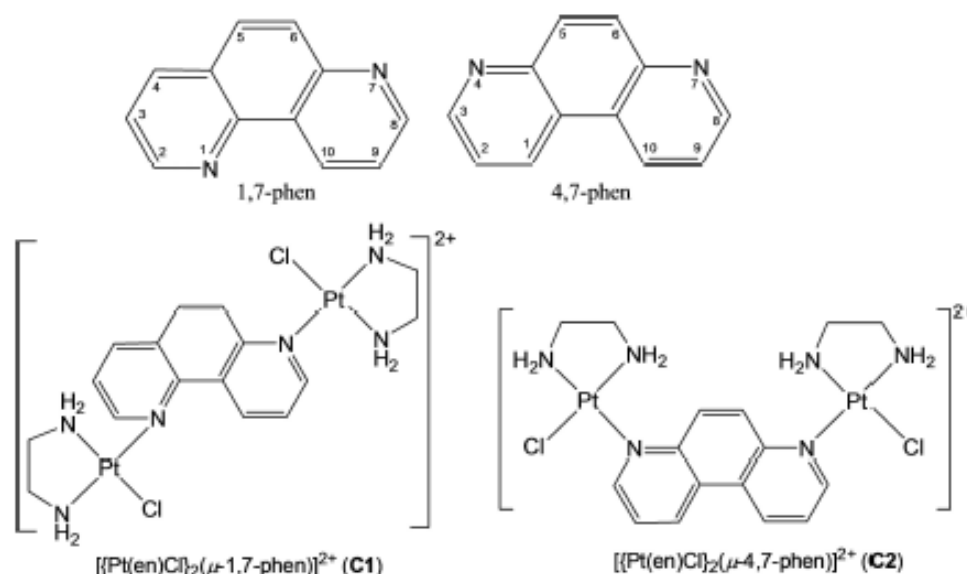


Figure 1. Structural formula of 1,7-phen and 4,7-phen ligands and corresponding dinuclear platinum(II) complexes **C1** and **C2**. Carbon atoms in the phenanthroline are labeled in accordance to the IUPAC rules.

Table 1. ^1H NMR chemical and coordination shifts (δ , ppm), alongside multiplicities for the free 1,7-phen and 4,7-phen ligands and the corresponding dinuclear Pt(II) complexes (C1 , C2) in CD_3COCD_3 as solvent.								
Atom position	C1H	C2H	C3H	C4H	C5H/C6H	C8H	C9H	C10H
1,7-phen	-	9.07, dd	7.73, m	8.46, dd	8.08, q	9.07, dd	7.73, m	8.46, dd
C1	-	9.55, dd	7.91, m	9.04, dd	8.45, d; 8.61, dd	9.55, dd	7.91, m	9.04, dd
		9.68, dd; 9.86, dd (+ 0.61; + 0.31)		9.18, d; 9.53, d (+ 0.18)		9.68, dd; 9.86, dd (+ 0.37; + 0.53)		9.18, d; 9.53, d (+ 0.61; + 0.31)
4,7-phen	9.03, dd	7.75, dd	9.23, dd	-	8.21, s	9.23, dd	7.75, dd	9.03, dd
C2	9.65, m (+ 0.62)	8.03, m (+ 0.28)	10.12, m	-	8.03, m (+ 0.18)	10.12, m (+ 0.89)	8.03, m (+ 0.89)	10.12, m (+ 0.62)

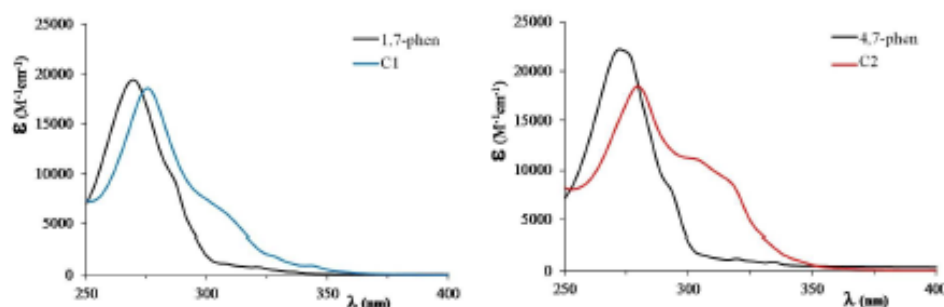


Figure 2. UV-vis spectra of C1 and C2 complexes measured in $5 \cdot 10^{-5}$ M dmf/H₂O (1:9, v/v) solution.

are listed in the Experimental section. The absorbance peaks for these complexes show significant red shifts compared to those for the uncoordinated *N*-heterocycles ($\lambda_{\text{max}} = 277$ and 280 nm for C1 and C2, respectively), indicating that the absorption observed for the complexes can be attributed to LMCT (ligand-to-metal charge transfer) transitions.^[76]

IR spectroscopy: The IR spectra of the complexes C1 and C2 recorded in the range of $4000\text{--}450$ cm^{-1} show the bands that are attributed to the coordinated *N*-heterocycles. A broad absorption band at $\sim 3426\text{--}3414$ cm^{-1} is assigned to the stretching vibration of OH group and confirms the presence of coordinated and crystalline water molecules in C1 and C2.^[76] Additionally, these complexes exhibit two very strong and sharp bands at ~ 3087 and 3070 cm^{-1} , which were assigned to the asymmetric and symmetric stretching vibrations, respectively, of the coordinated amino group of bidentate coordinated ethylenediamine ligand.^[76]

Complexes C1 and C2 exhibits a very strong band within range of $1146 - 1089$ cm^{-1} and a strong one at 626 and 627 cm^{-1} which can be attributed to the $\nu(\text{ClO})$ and $\delta(\text{OClO})$ modes, respectively, of the uncoordinated perchlorates.^[76] The presence of the two bands attributed to the asymmetric stretching vibration of ClO_4^- ion can be the consequence of its participation in hydrogen bonding interactions, which results in the lowering of the point group symmetry from T_d to C_2 , leading to "pseudomonodentate" spectroscopic behavior of ClO_4^- ion.^[76,77]

Cytotoxicity of platinum complexes C1 and C2

The cytotoxic activity of the two newly synthesized platinum (II)-complexes, C1 and C2 was evaluated against two different cancer cell lines: human breast carcinoma (MDA-MB-231) and mouse breast carcinoma (4T1) cell lines. A control group of non-cancerous cells were human fibroblasts (MRC-5). For comparison purposes, the cytotoxicity of cisplatin and oxalplatin has also been tested against all three previously mentioned cell lines. The diagrams describing the cytotoxicity of different concentrations of investigated compounds against MDA-MB-231 and 4T1 cells determined by MTT test after 24, 48 and 72 hours were presented in Figure 3. The cytotoxic effect of all examined compounds was dose-dependent: the increase of concentration of the tested complexes, cisplatin and oxalplatin, was followed by significant increase of cytotoxicity against tumor cells. Additionally, the cytotoxicity of investigated compounds was also time-dependent. The cytotoxicity of all compounds after 48 h and 72 h increased more than it did after 24 h. The only exception was platinum complex C1 against MDA-MB-231 cells. This compound showed no time-dependent increase in cytotoxicity against MDA-MB-231 cells after 48 h and 72 h in comparison to 24 h.

The results of *in vitro* cytotoxic activity of examined complexes, cisplatin and oxalplatin expressed as IC_{50} values were presented in Table 2. Also, selectivity indices are presented in Table 3. Platinum(II)-complex C1 displayed strong cytotoxic activity after 24 hours against human breast carcinoma MDA-MB-231 cells with IC_{50} value of 8.8 ± 1.1 μM . However, the effect was not time-dependent, with the increase of

Table 2. The concentrations of compounds that decreased cells' viability by 50%. IC_{50} values (μM) were determined after 24 h, 48 h and 72 hours of incubation. Data were expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm SD).

Compound (μM)	MDA-MB-231			4T1			MRC-5		
	IC_{50} (24 h)	IC_{50} (48 h)	IC_{50} (72 h)	IC_{50} (24 h)	IC_{50} (48 h)	IC_{50} (72 h)	IC_{50} (24 h)	IC_{50} (48 h)	IC_{50} (72 h)
C1	8.8 ± 1.0	7.3 ± 0.7	6.2 ± 1.1	14.3 ± 1.3	8.7 ± 0.6	6.9 ± 1.2	114.8 ± 12.8	107.1 ± 6.3	121 ± 4.7
C2	193.3 ± 14.5	174.8 ± 9.3	91.1 ± 4.8	> 500	190.4 ± 10.2	151.3 ± 9.6	> 500	> 500	401.0 ± 17.6
CDDP	138.4 ± 14.7	67.2 ± 3.1	28.9 ± 1.8	154.8 ± 12.4	58.1 ± 4.0	2.7 ± 0.4	372.6 ± 28.3	101.7 ± 6.9	39.4 ± 2.5
L-OHP	11.7 ± 1.6	7.5 ± 0.9	2.7 ± 1.0	179.3 ± 10.2	47.6 ± 3.2	2.1 ± 0.9	268.3 ± 17.9	38.6 ± 2.1	11.6 ± 1.3

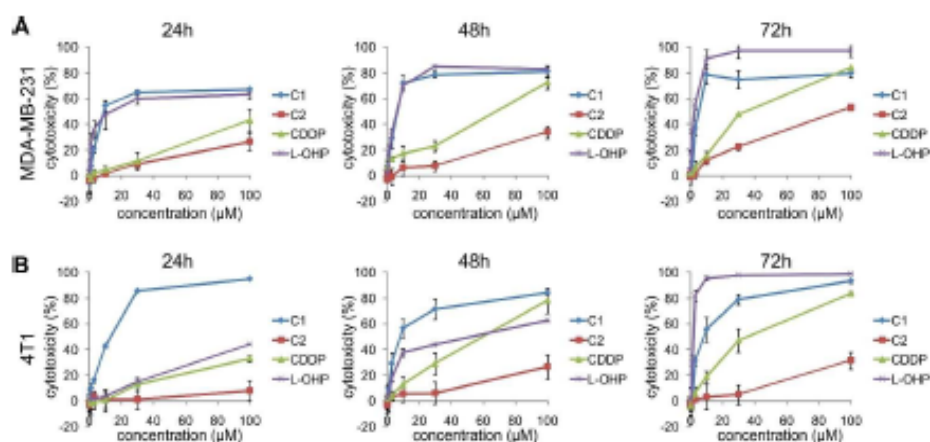


Figure 3. The cytotoxicity of two dinuclear platinum(II) complexes (C1 and C2), cisplatin (CDDP) and oxalplatin (L-OHP) against human, MDA-MB-231 (A) and mouse, 4T1 (B) breast carcinoma cells after 24, 48 and 72 hours. Data were expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm SD).

Compound	IC ₅₀ (MRC-5) / IC ₅₀ (tumor cell line)	MDA-MB-231	4T1
C1	17.4 \pm 1.1	15.5 \pm 0.9	
C2	4.4 \pm 0.2	2.7 \pm 0.2	
CDDP	1.4 \pm 0.1	14.6 \pm 0.9	
L-OHP	4.3 \pm 0.3	5.5 \pm 0.6	

Incubation to 48 h and 72 h, there were no significant increase in cytotoxicity against MDA-MB-231 cells, with IC₅₀ values of 7.3 \pm 0.7 μ M and 6.2 \pm 1.1 μ M for 48 and 72 hours, respectively. Moreover, the cytotoxicity of platinum(II)-complex C1 was about four times stronger compared to the cytotoxicity of cisplatin, but two times lower compared to oxalplatin under the same conditions (72 hours, Table 3, $p < 0.05$). Also, complex C1 exhibited strong cytotoxicity against mouse breast carcinoma, 4T1 cells and very low cytotoxicity against fibroblasts MRC-5 cells after 72 hours displaying IC₅₀ values 6.9 \pm 1.2 μ M and 121 \pm 4.7 μ M against 4T1 and MRC-5 cells, respectively (Table 2). Selectivity indices of C1 were significantly higher against human and breast cancer cells compared to cisplatin and oxalplatin after 72 hours (Table 3, $p < 0.05$) emphasizing their cytotoxic potential against breast

cancer cells. Platinum(II)-complex C2 also significantly decreased viability after 72 hours of treatment of MDA-MB-231 and 4T1 cells, displaying IC₅₀ values of 91.1 \pm 4.8 and 151.3 \pm 9.6 μ M, respectively. On the other hand, complex C2 showed lower cytotoxic activity against both types of breast cancer cells compared to cisplatin and oxalplatin (Table 2, $p < 0.05$). However, C2 displayed very low cytotoxic effects against MRC-5 fibroblasts (IC₅₀ > 400 μ M). But, selectivity index of C2 against MDA-MB-231 cells was significantly higher than cisplatin's

(Table 2, $p < 0.05$) and comparable to oxalplatin after 72 hours (Table 2, $p > 0.05$). Nevertheless, complex C2 was less selective against cancer cells than complex C1 (Table 2, $p < 0.05$). Both oxalplatin and cisplatin display strong cytotoxic effects on MRC-5 fibroblasts.

Effects of platinum(II)-complexes on apoptosis in human breast MDA-MB-231 and murine breast 4T1 carcinoma cells

In contrast to apoptosis, which is a process limited to individual cells, necrosis may induce inflammation of the surrounding tissue and consequently cause damage to surrounding cells. For that reason, provoking of cancer cells' apoptosis is the most suitable method for the treatment of different types of cancer.^[22] In order to determine the dominant method of cytotoxicity induced by C1 and C2 in MDA-MB-231 and 4T1 cells, the type of cell death was determined by Annexin V-FITC/PI staining and flow-cytometric analysis. Both examined breast carcinoma cells (MDA-MB-231 and 4T1) were grown in cell culture media containing platinum(II)-complexes at their respective IC₅₀ concentrations or in complete cell culture media alone (control) for 24 hours. Both tested platinum complexes, C1 and C2, significantly increased the percentage of early and late apoptotic cells in comparison to untreated control cells (Figures 4 and 5, $p < 0.05$). Our results showed that platinum complexes C1 and C2 in concentrations equal to their respective IC₅₀ (24 h) values, decreased viability of tested MDA-MB-231 and 4T1 cells predominantly by apoptosis. Only insignificant percentage of cells (< 7% of total population of cells) was in some cases necrotic. For that reason, these compounds might be suitable candidates for further anticancer evaluation.

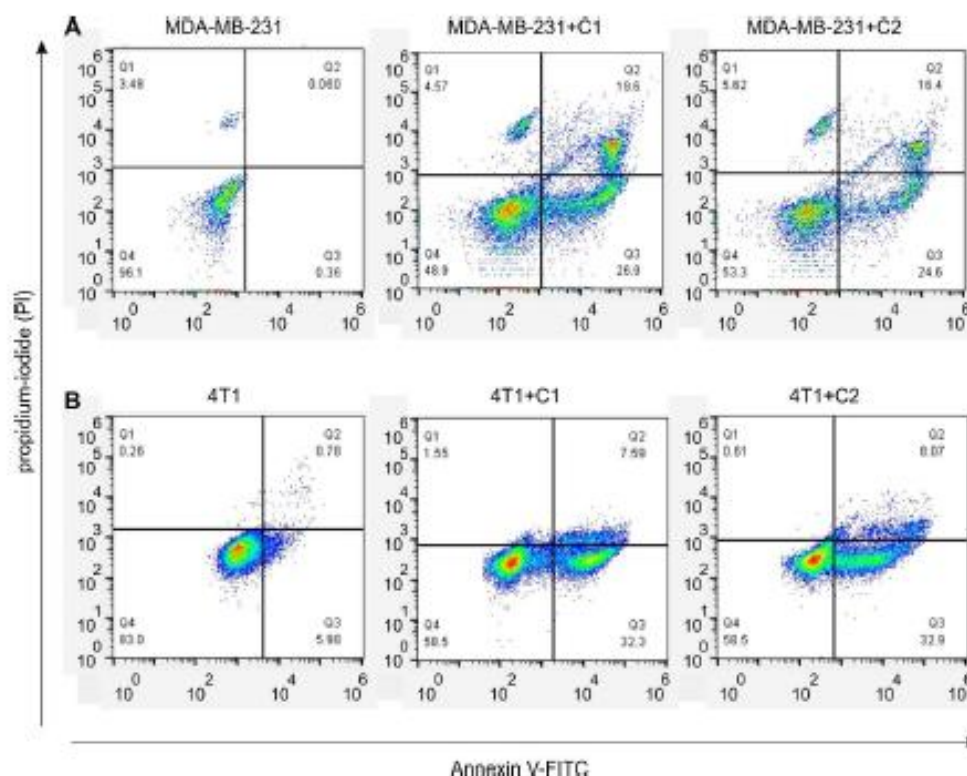


Figure 4. Flow cytometric analysis of Annexin V-FITC/PI staining. Dot plots present percentage of viable (lower left quadrant), early apoptotic (lower right quadrant), late apoptotic (upper right quadrant) and necrotic (upper left quadrant) cells in untreated (control) and treated (C1 and C2) human MDA-MB-231 (A) and mouse 4T1 (B) breast cancer cells.

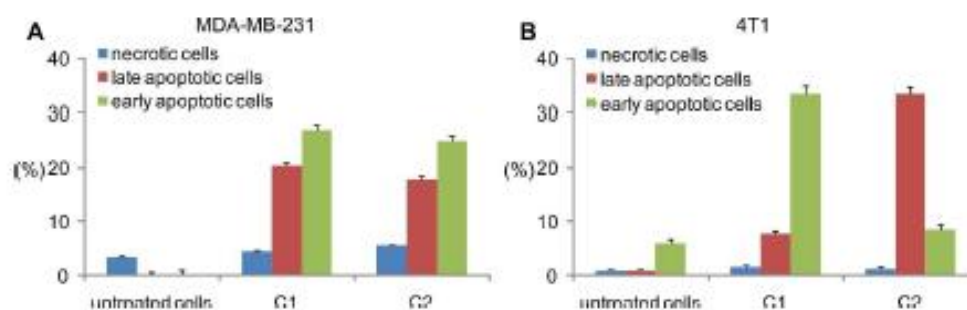


Figure 5. Average percentage of necrotic, late apoptotic and early apoptotic human MDA-MB-231 (A) and mouse 4T1 (B) breast cancer cells after three independent treatments with IC_{50} values of C1 and C2 compared to untreated cells. Data were expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm SD).

Effects of platinum(II)-complexes on cells cycle in human breast MDA-MB-231 and murine breast 4T1 carcinoma cells

Apoptosis and cell cycle arrest are two processes that are connected in various ways. For instance, it is well-known that G2/M cell cycle phase arrest is one of the possible mechanisms

for the induction of apoptosis. On the other hand, the G0/G1 phase arrest usually stops the cells from proliferation, but provides the cells with the possibility to repair the defects that are provoked and/or caused by anticancer agent(s).^[22] The effects of platinum(II)-complexes, C1 and C2, on cell cycle progression was evaluated after 24 h incubation with IC_{50}

concentrations of respective compounds. The results of our experiments showed that platinum(II) complex C1 induced G2/M phase arrest in treated MDA-MB-231 and 4T1 cells compared to respective untreated cells (Figures 6 and 7, $p < 0.05$). Platinum(II)-complex C1 caused G2/M phase arrest of breast carcinoma cells, which is probably caused by molecular changes in the cancer cells. These molecular changes may be one of the reasons for the induction of apoptosis caused by C1 in cancer cells *in vitro*. On the other hand, C2 caused G0/G1 phase arrest in treated MDA-MB-231 and 4T1 cells compared to respective untreated cells (Figures 6 and 7, $p < 0.05$).

Conclusions

The synthesis, spectroscopic characterization, and cytotoxic evaluation of two new dinuclear Pt(II) complexes, $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-1,7-phen)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C1) and $[[Pt(en)Cl]_2(\mu-4,7-phen)](ClO_4)_2 \cdot H_2O$ (C2), have been studied. *In vitro* cytotoxic activity of the complexes was evaluated against two tumor cell lines, human breast carcinoma (MDA-MB-231) and mouse breast carcinoma cells (4T1), and against human fibroblasts cells (MRC-5). Tested platinum(II) complexes, C1 and C2, showed different cytotoxic activity against human and murine breast carcinoma cells. Platinum complex C1 showed strong cytotoxic activity against both human (MDA-MB-231) and murine (4T1) breast carcinoma cells, displaying stronger selectivity toward carcinoma cells in comparison to cisplatin and oxaliplatin. On the other hand, C2 displayed lower cytotoxicity than cisplatin and oxaliplatin against cancerous and non-cancerous cells, with selectivity that is comparable to oxaliplatin's. The decrease of viability of breast cancer cells is induced by apoptosis and G2/M or G0/G1 phase arrest caused by complexes C1 and C2, respectively. Complex C1, although having a significantly lower cytotoxicity against tumor cells in comparison to cisplatin and

oxaliplatin, with selectivity that is comparable to oxaliplatin's. The decrease of viability of breast cancer cells is induced by apoptosis and G2/M or G0/G1 phase arrest caused by complexes C1 and C2, respectively. Complex C1, although having a significantly lower cytotoxicity against tumor cells in comparison to cisplatin and

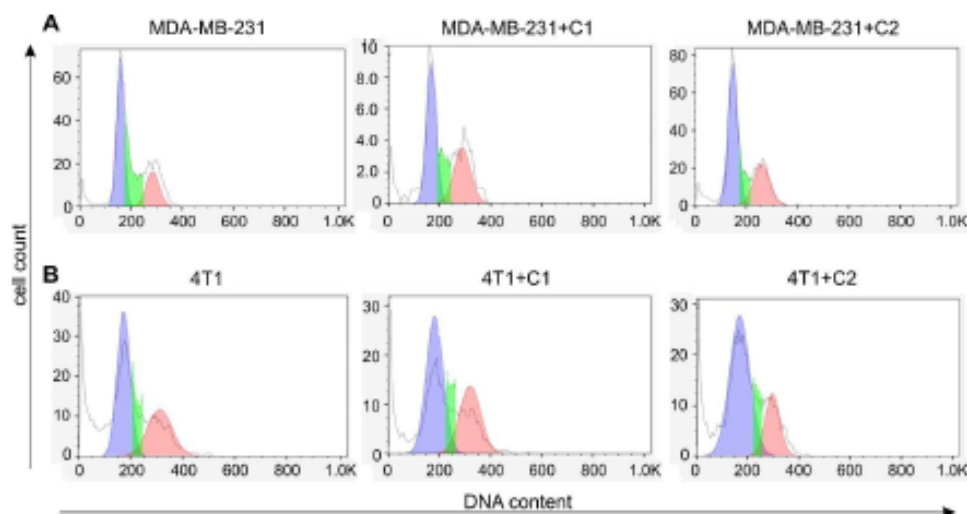


Figure 6. Representative histograms presenting the effects of platinum complexes C1 and C2 on cell cycle distribution of untreated and treated human MDA-MB-231 (A) and mouse 4T1 (B) breast carcinoma cells.

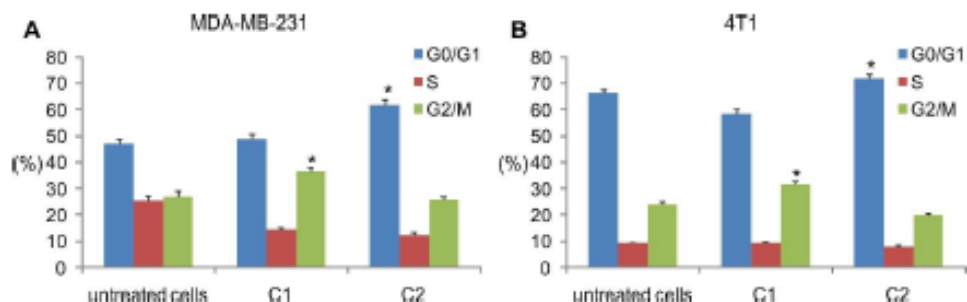


Figure 7. Effects of platinum complexes C1 and C2 on cell cycle distribution of untreated and treated human MDA-MB-231 (A) and mouse 4T1 (B) breast carcinoma cells. Data were expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm SD).

oxaliplatin, is more selective towards cancer cells than the aforementioned cytostatics.

Supporting Information

Summary Supporting Information PDF file contains experimental procedures for the syntheses of compounds **C1** and **C2**, full characterization of all compounds and experimental procedures for biological evaluation of complexes **C1** and **C2**.

Acknowledgements

This work has been financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, under Grant No. 172036. This research has also received funding from the Serbian Academy of Sciences and Arts under strategic projects programme - grant agreement No. 01-2019-F65 and project of this institution No. F128.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: apoptosis · cell cycle · cytotoxicity · dinuclear platinum(II) complexes · spectroscopic characterization

- [1] A. Jemal, M. M. Center, C. DeSantis, E. M. Ward, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010, 19, 1893-1907.
- [2] D. Munoz, A. M. Near, N. T. van Ravesteyn, S. J. Lee, C. B. Schachter, O. Alagoz, D. A. Berry, E. S. Burnside, Y. Chang, G. Chisholm, H. J. de Koning, M. Ali Ergun, E. A. Heijnsdijk, H. Huang, N. K. Stout, B. L. Sprague, A. Trentham-Dietz, J. S. Mandelblatt, S. K. Plevritis, *J. Natl. Cancer Inst.* 2014, 106, dju289.
- [3] S. K. Plevritis, D. Munoz, A. W. Kurlan, N. K. Stout, O. Alagoz, A. M. Near, S. J. Lee, J. J. Van Den Broek, X. Huang, C. B. Schachter, B. L. Sprague, Association of screening and treatment with breast cancer mortality by molecular subtype in US women, 2000-2012. *Jama.* 2018, 319, 154-164.
- [4] M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, P. Paoli, *Coord. Chem. Rev.* 2016, 310, 41-79.
- [5] I. Ali, W. A. Wani, K. Saleem, A. Haque, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2013, 13, 296-306.
- [6] W. D. den Brok, C. H. Speers, L. Gondara, E. Baxter, S. K. Tyldesley, C. A. Lohrisch, *Breast Cancer Res. Treat.* 2017, 161, 549-556.
- [7] M. Bonotto, L. Gerratana, E. Poletto, P. Driol, M. Giangreco, S. Russo, A. M. Mintsini, C. Androetta, M. Mansutti, F. E. Pisa, G. Fasola, F. Puglisi, *Oncologist* 2014, 19, 608-615.
- [8] A. Haque, R. Ilmi, I. Juma Al-Busaidi, M. S. Khan, *Coord. Chem. Rev.* 2017, 350, 320-339.
- [9] A. Lee, M. B. Djarnoz, *Cancer Treat. Rev.* 2018, 62, 110-122.
- [10] G. Pistrutto, D. Trisciuoglio, C. Coci, A. Garufi, G. D'Orazi, *Aging (Albany NY)* 2016, 8, 603-619.
- [11] J. F. Kerr, C. M. Winterford, B. V. Harmon, *Cancer* 1994, 73, 2013-2026.
- [12] N. Farrell, S. Spinelli in *Uses of inorganic Chemistry in Medicine* (Eds: N. Farrell), Royal Society of Chemistry, London, 1999; pp. 124-134.
- [13] S. Komoda, M. Lutz, A. L. Spek, M. Chikuma, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 2000, 39, 4230-4236.
- [14] S. Komoda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4738-4746.
- [15] L. Senarovic, M. D. Živkovic, A. Veselinovic, A. Pavic, M. I. Djuran, S. Rajkovic, J. Nikodimovic-Runic, *J. Med. Chem.* 2015, 58, 1442-1451.
- [16] B. Konovalov, M. D. Živkovic, J. Z. Milovanovic, D. B. Djordjevic, A. N. Arsenijevic, L. R. Vask, G. V. Janjic, A. Franich, D. Manojlovic, S. Skirvanj, M. Z. Milovanovic, M. I. Djuran, S. Rajkovic, *Dalton Trans.* 2018, 47, 15091-15102.
- [17] D. P. Asanin, M. D. Živkovic, S. Rajkovic, B. Warzajtis, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Polyhedron* 2013, 51, 255-262.
- [18] J.-A. Zhang, M. Pan, J.-Y. Zhang, H.-K. Zhang, Z.-J. Fan, B.-S. Kang, C.-Y. Su, *Polyhedron* 2009, 28, 145-149.
- [19] S. Chattopadhyay, P. Chakraborty, M. G. B. Drew, A. Ghosh, *Inorg. Chim. Acta* 2009, 362, 502-508.
- [20] K. N. Lazarou, I. Chadjistamatis, A. Terzis, S. P. Perlepes, C. P. Raptopoulou, *Polyhedron* 2009, 29, 1870-1879.
- [21] K. N. Lazarou, C. P. Raptopoulou, S. P. Perlepes, V. Psycharis, *Polyhedron*, 2009, 28, 3185-3192.
- [22] S. Dhar, M. Nothajl, A. R. Chakravarty, *J. Inorg. Biochem.* 2005, 99, 805-812.
- [23] P. Čanović, A. R. Simović, S. Radosavljević, I. Bratsos, N. Demitri, M. Mitrović, I. Zelen, Ž. D. Bugarić, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2017, 22, 1007-1028.

Submitted: August 31, 2019
Accepted: November 7, 2019

THE ROLE OF TUMOR MICROENVIRONMENT AND IMPACT OF CANCER STEM CELLS ON BREAST CANCER PROGRESSION AND GROWTH

Nenad Marković^{1,4}, Ana Luković⁴, Nebojša Arsenijević², Srđan Ninković^{1,4} and Biljana Ljujić²

¹University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Surgery

²University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics

³University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research

⁴Clinical center "Kragujevac", Kragujevac, Serbia, Clinic for General and Thoracic Surgery

⁵University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, PhD student

ULOGA TUMORSKE MIKROSREDINE I UTICAJ KANCERSKIH MATIČNIH ČELIJA NA PROGRESIJU I RAST KARCINOMA DOJKE

Nenad Marković^{1,4}, Ana Luković⁴, Nebojša Arsenijević², Srđan Ninković^{1,4} i Biljana Ljujić²

¹Univerzitet u Kragujevcu, Srbija, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za hirurgiju

²Univerzitet u Kragujevcu, Srbija, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za genetiku

³Univerzitet u Kragujevcu, Srbija, Fakultet medicinskih nauka, Katedra za Mikrobiologiju i imunologiju, Centar za molekularnu medicinu i istraživanje matičnih ćelija.

⁴Klinički centar "Kragujevac", Kragujevac, Srbija, Klinika za Opštu i grudnu hirurgiju

⁵Univerzitet u Kragujevcu, Srbija, Fakultet medicinskih nauka, Student doktorskih akademskih studija

Received / Primljen: 06. 07. 2017.

Accepted / Prihvaćen: 09. 06. 2018.

ABSTRACT

Breast cancer is not only a mass of genetically abnormal tissue in the breast. This is a well-organized system of a complex heterogeneous tissue. Cancer cells produce regulatory signals that stimulate stromal cells to proliferate and migrate; then, stromal elements respond to these signals by releasing components necessary for tumor development that provide structural support, vasculature, and extracellular matrices. Developing tumors can mobilize a variety of cell types from both local and distant niches via secret chemical factors derived from cancer cells themselves or neighboring cells disrupted by growing neoplasm, such as fibroblasts, immune inflammatory cells, and endothelial cells. CSCs are a group of very few cells that are tumorigenic (able to form tumors) and are defined as those cells within a tumor that can self-renew and lead to tumorigenesis. BCSCs represent a small population of cells that have stem cell characteristics and are related to breast cancer. There are different theories about the origin of BCSCs. BCSCs are responsible for breast carcinoma metastasis. Usually, there is a metastatic spread to the bones, and rarely to the lungs and liver. A phenomenon that allows BCSCs to make the transition from epithelial to mesenchymal expression and thus avoid the effect of cytotoxic agents is the epithelial-mesenchymal transition (EMT). During this process, cells change their molecular characteristics in terms of loss of epithelial characteristics taking the mesenchymal phenotype. This process plays a key role in the progression, invasion, and metastasis of breast tumors.

Keywords: cancer stem cell, tumor microenvironment, breast cancer stem cell, resistance to conventional therapy

SAŽETAK

Rak dojke nije samo masa genetski abnormalnog tkiva u grudima. Ovo je dobro organizovan sistem koji gradi složeno heterogeno tkivo. Čelije raka proizvode regulatome signale koji stimulišu stromalne ćelije da proliferišu i migriraju, zatim stromalni elementi reaguju na ove signale oslobađanjem komponenti neophodnih za razvoj tumora koji pružaju strukturu podršku, vaskulaturu i ekstracelularne matrikse. Razvijanje tumora može mobilisati različite tipove ćelija iz lokalnih i udaljenih niša preko tajnih hemijskih faktora koji potiču iz samih ćelija karcinoma ili susjednih ćelija poremećenih rastućom neoplazmom, kao što su fibroblasti, imunološke inflamatorne ćelije i endotelne ćelije. CSCs (kancerske matične ćelije) su vrlo malo ćelija koje su tumorske (sposobne za formiranje tumora) i definisane su kao one ćelije unutar tumora koje mogu samopovršiti i dovesti do tumorigenize. BCSCs (matične ćelije karcinoma dojke) predstavljaju malu populaciju ćelija koje imaju karakteristike matičnih ćelija i odnose se na rak dojke. Postoje različite teorije o poreklu BCSCs. BCSCs su odgovorne za metastazu karcinoma dojke. Obično postoji metastatsko širenje u kosti i retko u plućima i jetri. Fenomen koji dozvoljava BCSCs da pređe sa epitelijalnog na mezenhimalnu ekspresiju i na taj način izbegava dejstvo citotoksičnih agenasa, je epitelno-mezenhimalna tranzicija EMT. Tokom ovog procesa ćelije mijenjaju molekularne karakteristike u smislu gubitka epitelnih karakteristika uzimajući mezenhimalni fenotip. Ovaj proces igra ključnu ulogu u progresiji, invaziji i metastaziranju tumora dojke.

Ključne reči: kancerske matične ćelije, tumorska mikrosredina, matične ćelije karcinoma dojke, otpornost na konvencionalnu terapiju

ABBREVIATIONS

TME-tumor microenvironment	APC-antigen presenting cells
CAFs- carcinoma-associated fibroblasts	BCSCs- breast cancer stem cells
TAMs-M2-tumor-associated macrophages	ALDH 1-Aldehyde dehydrogenase 1
CSCs-cancer stem cells	ECM-extracellular matrix
MSCs-mesenchymal stem cells	EMT- Epithelial-mesenchymal transition



INTRODUCTION

The tumor is a tissue mass resulting from its abnormal growth. Conventionally, this mass is classified as a benign, malignant, and so-called tumor in situ. Until the formation of a tumor, cells go through specific stages of metaplasia and dysplasia. However, not always do metaplasia and dysplasia finally result in the creation of a neoplasm (1-3).

Analogously to the above, breast cancer is formed as a result of breast tissue cells' abnormal growth. Breast cancer is not only a mass of genetically abnormal tissue in the breast. This is a well-organized system of complex heterogeneous tissue (4). This heterogeneity in the tissue and understanding of cancer as a heterogeneous disease that helps to understand disease progression and treatment failure (5).

Cancer cells produce regulatory signals that stimulate stromal cells to proliferate and migrate; then, stromal elements respond to these signals by releasing components necessary for tumor development that provide structural support, vasculature, and extracellular matrices (6). It is increasingly appreciated that tumor-stroma crosstalk is an important event for cancer initiation, growth, and progression (7). Developing tumors can mobilize a variety of cell types from both local and distant niches through production of chemical factors derived from cancer cells themselves or neighboring cells disrupted by growing neoplasm, such as fibroblasts, immune and inflammatory cells, and endothelial cells. This assortment of cells and molecules together comprises the tumor microenvironment (TME) (8). TME is composed of extracellular matrix (ECM) and many distinct cell types, including carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), tumor-associated macrophages (TAMs-M2), cancer stem cells (CSCs), mesenchymal stem cells (MSCs), myofibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells and their precursors, pericytes, neutrophils, eosinophils, basophils, mast cells, T and B lymphocytes, natural killer cells (NK), and antigen presenting cells (APC) such as macrophages and dendritic cells (Fig. 1). These non-tumor cells have important roles not only in tumor initiation, progression, and metastasis but also in therapeutic resistances (9-11).

In breast cancer, the most frequent component of tumor stroma is CAFs. There are many hypotheses about the origin of CAFs (12). The dominant role of CAF in tumor tissues is to increase the expression of matrix metalloproteinase-14 (MMP14) and MMP9 activity, which promote tumor invasion and metastasis (13, 14). Besides the origin, these cells differ by expressing different surface markers which are mainly dependent on the tissue origin. In breast cancer, important CAF markers are fibroblast activation protein (FAP) and a combination of platelet-derived growth factor- α and β receptor (PDGFR- α and β) and α -smooth muscle actin (α -SMA) (13). However, some studies have demonstrated that CAF can promote tumor progression in other ways. It has been demonstrated that CAF-derived CCL2 increases number of breast cancer stem cells (CSCs) which promotes metastasis (15).

Many immune cells, such as macrophages, NK cells, regulatory T cells (Tregs), myeloid-derived suppressor cells have also been implicated in breast cancer development (16). Macrophages can alter their polarization state from M1 to M2 (17). 'Alternatively-activated' M2 macrophages produce anti-inflammatory cytokines like IL-10 and express non-inflammatory chemokines CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 and have pro-tumorigenic functions (18). TAMs are mostly M2 macrophages populations that are either tissue-resident or derived from peripheral reservoirs such as the bone marrow and spleen. The role of TAMs in breast cancer is to promote immunosuppression, neo-angiogenesis, and tumor cell migration and invasion (19). TAMs accumulate in regions of hypoxia which regulate the expression of M2-related genes that promote angiogenesis. By the production of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and placental growth factor (PlGF), TAMs induce neoangiogenesis. TAMs-derived epidermal growth factor (EGF) and proteases, such as cysteine cathepsins, promote tumor progression and invasion (16). Studies show that a decrease of mammary tissue macrophages and an increase of TAMs in patients with breast cancer is a bad prognostic sign (20).

The suppression and evasion of the host immune system during the progression of tumors can be achieved even through inhibition of effector immune cells or via stimulation of immunosuppressive cells. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and Treg cells suppress host immune system and contribute to tumorigenesis through enhancement of tumor immune evasion (21). MDSCs are immature myeloid cells which derange tumor-associated antigen presentation, the polarization of macrophage, and the activation of cytotoxic T cells and NK cells. Besides these functions, it has been shown that Treg cells can produce VEGF-A and induce neoangiogenesis. A high number of Treg cells in TME reduces the survival rate of breast cancer patients (17).

NK cells are important immune cells in anticancer immune response. NK cells control tumor initiation; however, they undergo crucial alterations during cancer progression (22). In tumor microenvironment, different factors have an effect on the phenotype and function of these cells (23). There are two subpopulations of NK cells in tumor stroma, tumor-infiltrating natural killer cells (TINKs) and tumor-associated natural killer cells (TANKs). TINKs and TANKs have changed cytokine expression and increased levels of pro-angiogenic factors important for neoangiogenesis and tumor progression (19).

Myofibroblasts are cells with the characteristics of myoblasts and fibroblasts which have an important role in breast cancer progression and invasion. Genes expressed in tumor myofibroblasts encode chemokines CXCL12 and CXCL14, important in breast cancer progression. CXCL12 have a role in the earlier stages of breast tumorigenesis, while CXCL14 probably participate in inflammation (24).

MSCs are multipotent cells that are capable of modulating tumor microenvironment and have an immunomodulatory

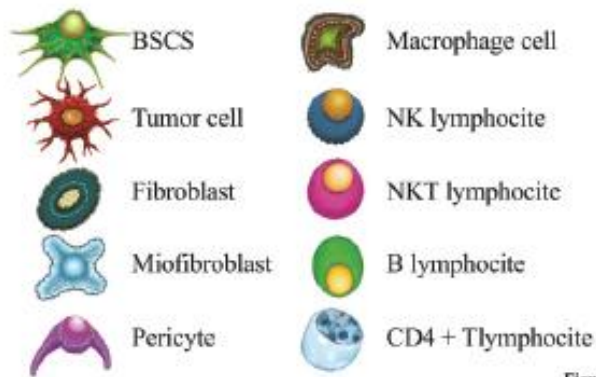
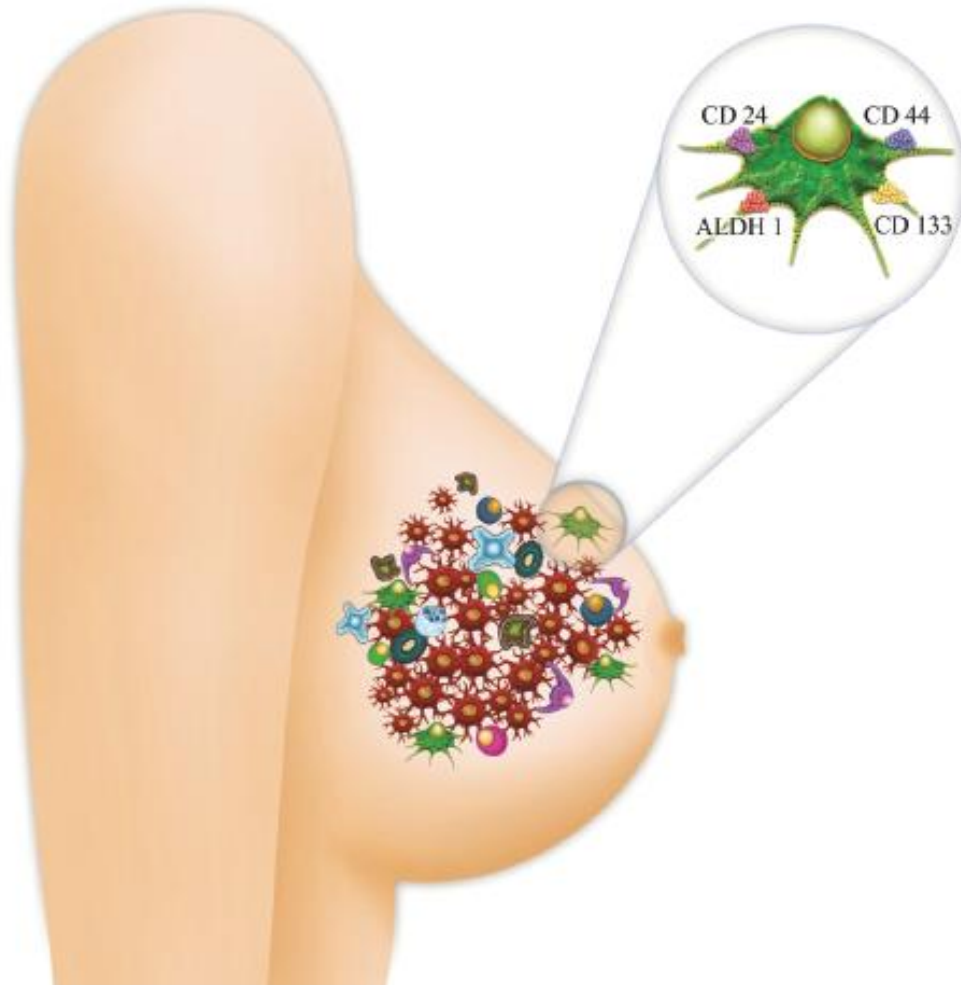


Figure 1. Tumor microenvironment

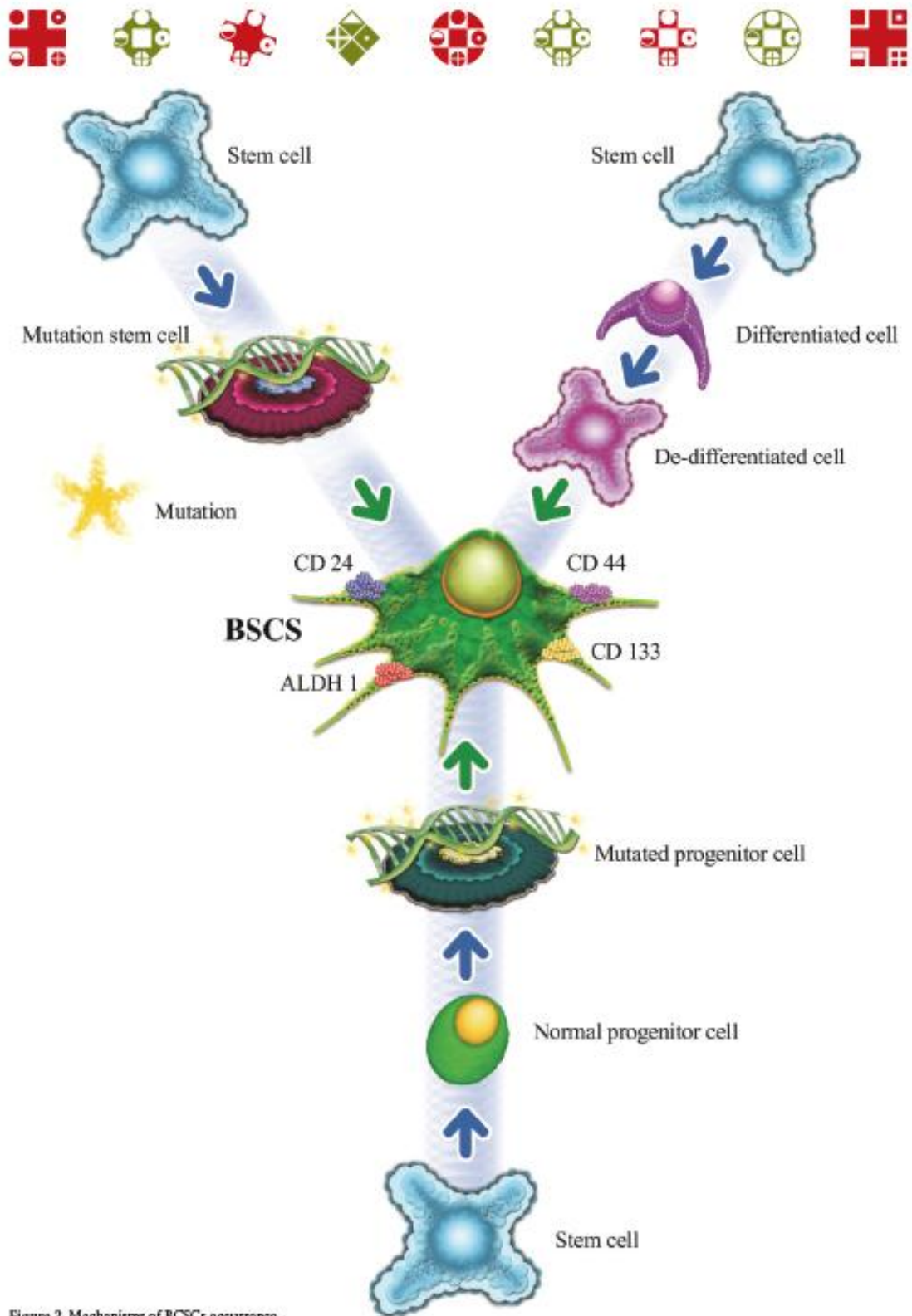


Figure 2. Mechanisms of BCSCs occurrence.



tory function. Through these functions, these cells support breast cancer growth and progression (25). The immunomodulatory function is dominantly immunosuppressive and includes changing of immune responses from Th1 to Th2 or induction of Treg production and proliferation (26).

BCSCs have been associated with tumor initiation, progression, metastasis and resistance to conventional therapy. These small subpopulation of cells inside the tumor mass can be influenced by the other components of tumor microenvironment through complex interactions. T cells and CAFs from breast cancer microenvironment can both induce and inhibit BCSCs. Treg produce factors such as VEGF and TGF- β which promote cancer stemness and BCSC expansion and effects of the tumor microvasculature and angiogenesis (27). Loss of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) by CAF through activation of Notch signaling pathway and up-regulation of typical BCSCs markers increase the formation of distant metastasis. BCSCs express reduced levels of NK ligands what is BCSCs mechanism for immune escape and also is connected with metastatic spread (28). Other cells including TAMs, MSCs and endothelial cells have effects on BCSCs through networks of cytokines and growth factors. Notch, Hedgehog, Wnt, PI3K, NF- κ B, and Jak/STAT stem cell regulatory pathways in breast cancer are most often dysregulated by signals from the tumor microenvironment. Notch signaling pathway regulate the self-renewal of BCSCs. TAM-derived factors promote BCSCs self-renewal and maintenance, as well, BCSC-derived factors induce protumor signals in TAMs (29).

Although, breast cancer tissue is composed from descripted cells, it has been noted that different tumor cells may show differences that can be reflected in the cell morphology, gene expression, metabolism, movement, proliferation, and metastasis (30). This functional heterogeneity among cancer cells has led to the creation of at least two models, which have been put forward to account for heterogeneity and differences in tumor-regenerative capacity: the cancer stem cell (CSCs) and clonal evolution models (31).

Under normal conditions, it has been observed that stem cells create a new stem cell and a progenitor cell. In this situation, the progenitor cell provides a differentiated cell. Either by the influence of direct mutations or the effect of external factors, cells enter into a de-differentiation process and lose their specificity and, as such, these cells can lead to the formation of cancer stem cells (32). Also, certain cells may end the differentiation process before the progenitor cell whose mutations can still lead to CSCs (Fig. 2).

It has been proven for many tumors that *de novo* mutations and events lead to the formation of BCSCs. Biological characteristics of BCSCs are various. Thanks to the specific mutation within tumor cells and its nature, BCSCs frequency, cell-surface phenotype, and drug sensitivity may vary. Also, tumor progression will depend on the tumor itself, i.e. its pathogenesis or a decisive challenge for chemotherapy, which is responsible for BCSCs biology (33).

BCSCs are a group of very few cells that are tumorigenic (able to form tumors) and are defined as those cells within a tumor that can self-renew and lead to tumorigenesis. There are two models of tumors development and growth described so far. One of these models is BCSCs model and it postulates a hierarchical organization of cells such that only a small subset is responsible for sustaining tumorigenesis and establishing the cellular heterogeneity inherent in the primary tumor (34).

On the other hand, the clonal evolution model claims that all cells within a tumor do their bit in varying degrees to maintain a tumor (35). In this model, a number of genetic and epigenetic changes occur over time, leading to the result that the most aggressive cancer cells are ultimately liable for breast tumor progression. The initial tumor cell evolution may occur by two methods: linear and branched expansion (36).

BREAST CANCER STEM CELLS (BCSCs)

Previous studies results demonstrated that the processes of breast tumors initiation, progression, and proliferation occur thanks to the small group of BCSCs which is able to self-renew and differentiate (37). Features of BCSCs are the result of the impact of complex molecular mechanisms or microenvironment (38, 39). Cytokines and their impact on the BCSCs microenvironment are responsible for tumor heterogeneity and the so-called plasticity of BCSCs (40).

BCSCs represent a small population of cells that have stem cell characteristics and are related to breast cancer. There are different theories about the origin of BCSCs. One of them states that improper regulation or mutations may lead to the transformation of normal stem cells into breast cancer stem cells (BCSCs) (41). According to another, the "misplacement somatic stem cell" theory, BCSCs may originate from misplacement of somatic stem cells *de novo* (42). Evidence shows that somatic cells can be considered the BCSC origin. There are studies that suggest there are intratumoral lineages differentiated from common progenitor cells (43). BCSCs were isolated from breast tumor tissue and the cell was characterized as CD44+/CD24-/low Lin- phenotype (44). CD44 is a cell surface glycoprotein and a specific receptor for hyaluronan. It is a crucial element for breast cancer adhesion, motion, migration, and invasion, and its interaction with osteopontin causes tumor progression. It has an important role in cell proliferation and tumor angiogenesis (38, 39). CD24, a second-surface glycoprotein expressed at low levels, increases tumor's ability to grow and metastasize (38). However, one report shows that CD44+CD24- is not expressed in all breast cancer cell populations (45). The results of some studies show that CSCs is to identify the presence of very important ALDH markers (46). Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH 1) consists of a family of cytosolic enzymes involved in the oxidation of intracellular aldehydes and oxidizes retinol to reti-



noic acid during stem cells differentiation. ALDH1 plays a role in stem cells differentiation and its activity forecasts poorer clinical outcomes (47). The other markers that have been used to identify BCSCs include CD133, CD49fh, and CD61 (48, 49). Although the list of CSCs markers grows, some researchers do not consider these markers suitable for identifying CSCs.

The immediate environment of the BCSCs consists of a group of various cells and molecules which together forming a BCSCs niche. This niche provides adequate physical and chemical conditions for the development of tumors (include fibroblast stimuli, immune cells, autocrine signals, and extracellular matrix (ECM) components, oxygen pressure, nutrients, and PH (50). Those cells produce cytokines such as interleukin IL-1, IL-6, and IL-8, CXCL12, CCL2, and growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), TGF- β , TNF- α , EGF, vascular endothelial growth factor, and FGF that are responsible for tumor growth and progression (51). This is supported by studies which have shown that blockage of the IL-6 receptor can inhibit tumor metastasis and growth (52). The other results show that blockage of TGF- β with IL-8 inhibition increases the number of BCSCs in triple negative breast cancer and prevents tumor formation in preclinical models (53). This and other studies show that the cell niche content can and should be an important point for a breast cancer targeted therapy (54).

BCSCs are responsible for breast carcinoma metastasis. Usually, there is a metastatic spread to the bone, and rarely to the lungs and liver (55). The basic molecules of the breast cancer target tissue are hyaluron and osteopontin that exhibit binding sites for the CD44 molecules in BCSCs (bone, brain, liver, and lung, bone marrow endothelium). Osteopontin is associated with a higher incidence of tumor metastasis and invasion (56).

A phenomenon that allows BCSCs to make the transition from epithelial to mesenchymal expression and thus avoid the effect of cytotoxic agents is called *epithelial-mesenchymal transition EMT* (57). During this process, cells change their molecular characteristics in terms of loss of epithelial characteristics taking a mesenchymal phenotype. This process plays a key role in the progression and invasion of metastasis breast tumors. Throughout EMT, some changes occur such as the shutdown of transcription and regulation of epithelial markers such as E-cadherin, and the appearance of mesenchymal markers such as vimentin, fibronectin, and N-cadherin. This leads to destabilization of structures and functions in these cells (58). This transformation leads to cancer cells migration and invasion. It has been found that malignant cells with mesenchymal characteristics are more resistant to therapy and EMT provides an increase in the number of cancer stem-like cells (59). BCSCs are also responsible for a large number of breast cancer subsets and have a great clinical significance (60). It is necessary to take into account the fact that tumor is heterogeneous and that the characteristics of BCSCs in one region may be an inadequate predictor for the outcome of

the whole breast cancer (61). The results of many studies suggest the need for testing BCSCs as a prognostic factor for different types of breast cancer outcome (Fig. 3).

RESISTENCE OF BCSCs TO CONVENTIONAL THERAPY

Recent studies suggested that BCSCs possess inbred chemo- and radiation-therapy resistance mechanisms which allow them survive. Resistance of BCSCs to conventional therapy is provided by several mechanisms such as DNA damage repair, cell cycle checkpoint proteins activation, activation of self-renewal pathways or avoidance of apoptosis (62). Radiation induces cell death through DNA damage. All cells respond to DNA damage by activation of detection and repair mechanisms which includes ATM (ataxia telangiectasia mutated) and the checkpoint kinases, Chk1 and Chk2, initiating cell cycle arrest, repair of DNA or apoptosis. BCSCs use these mechanisms more rapidly than non-stem cancer cells and avoid radiation-induced cell death (63). Other potential radioresistance mechanisms is activation of Wnt/ β -Catenin signalling pathway which promotes DNA damage tolerance. Jagged-1 expression and the Notch signalling pathway have also been implicated as playing roles in radioresistance. In the mammary gland, Wnt/ β -catenin, Notch and Hedgehog (Hh) signalling pathways induce stem cell self-renewal and they are potential targets for therapy (64).

ATP-binding cassette (ABC)-G2 transporters, such as breast cancer resistance protein (BRCP-ABCG2) and MDR-associated protein-1 (ABCB1/MDR1), class of drug transporters are often the cause of multidrug resistance. These transporters are expressed on normal stem cells and cancer stem cells and they are capable of pumping out of these cells different substances, including cytotoxic drugs (65). Some clinical studies have been shown that another possible reason for chemotherapy and radiation-therapy resistance can be high expression of CD44 and low expression of CD24 on breast cancer cells (66).

However, the clinical relevance of BCSCs in human breast cancer is still under debate. Also, the question arises as to whether there are any differences between BCSCs and tumor-initiating cells.

CONCLUSION

Role of BCSCs is remarkable in tumor progression and metastasis. Extensive interactions among cancer stem cells, their microenvironments, and other present cells initiate a cascade of growth factors and inducing elements, which in turn influence cancer stem cell role in breast cancer. This population is resistant to conventional therapies due to enhanced membrane transport by specific protein transporters, specific mechanisms of DNA repair, and ROS scavenging systems, and the ability to detoxify cyto-

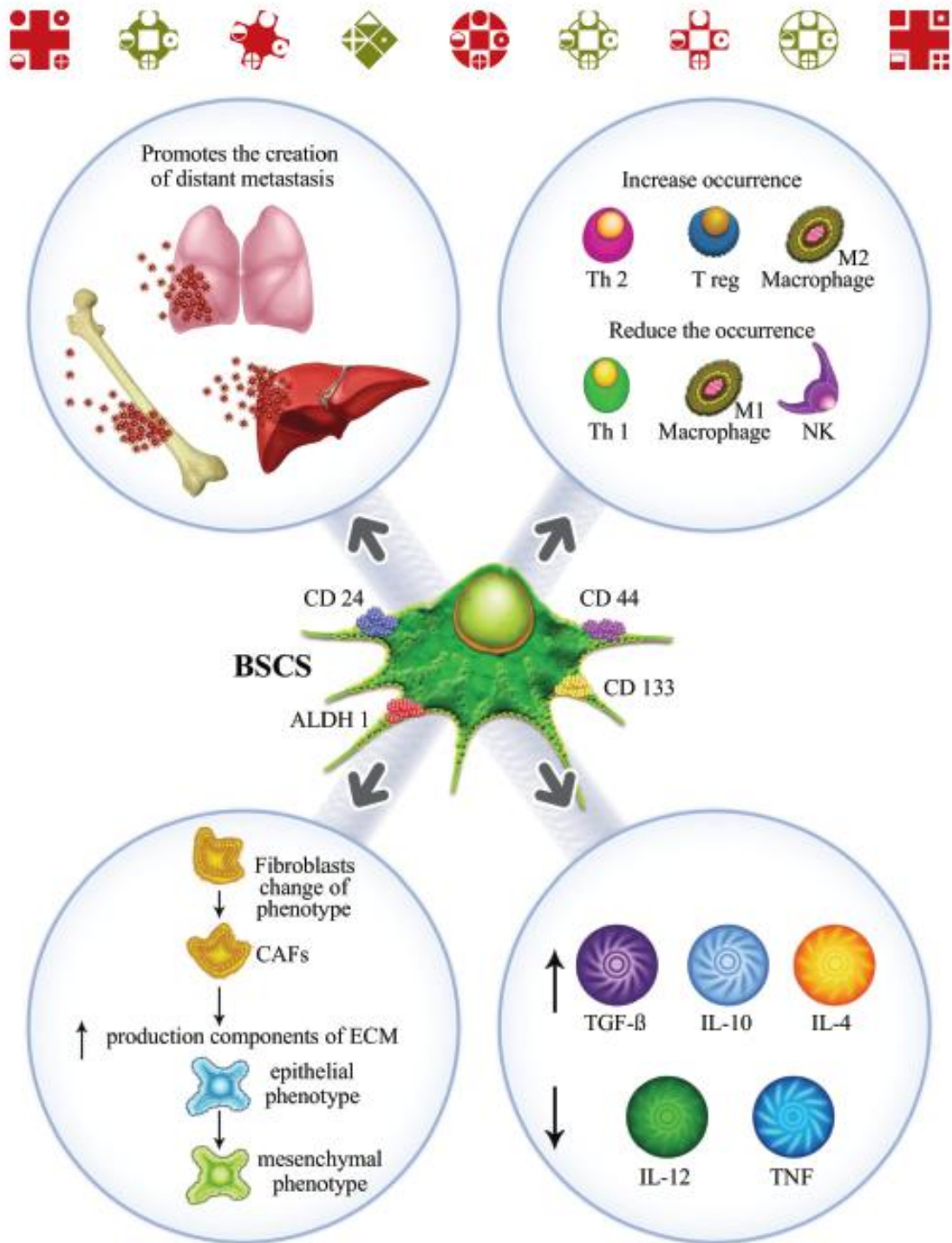


Figure 3. Impact of BSCs on tumor microenvironment and on progression and invasion of metastasis



toxic drugs. Transcriptional factors, signaling pathways, and tumor suppressor genes act to maintain and amplify a state of stability. More studies are needed to investigate each of these aspects of BCSCs. And finally, the BCSCs as a key point of breast cancer should be subjected to a study in order to individualize the therapy directed to the system of a given breast cell carcinoma.

REFERENCES:

1. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Olson JD, Mintz A, Delbono O. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;1;307(1):C25-38.
2. Trends and Controversies in Multi-Disciplinary Care of the Breast Cancer Patient Laura S. Dominici, Monica Morrow, Elizabeth Mittendorf, Jennifer Bellon, Tari A. King *Curr Probl Surg.* Author manuscript; available in PMC 2017 Dec 1. Published in final edited form as: *Curr Probl Surg.* 2016;53(12): 559–595.
3. Colin C, Schott AM. Re: Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(1):77.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365(9472):1687–717.
5. Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Normal and Dysplastic Hematopoiesis-Masters of Survival and Clonality? *Int J Mol Sci.* 2016;17(7): E1009.
6. Ciuffo BG, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh Migr.* 2012;6(3):220-30.
7. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1324-31.
8. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 2013;4(1):66-83.
9. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007;67(21):10123-8.
10. D'souza N, Burns JS, Grisendi G, Candini O, Veronesi E, Piccinno S, Horwitz EM, Paolucci P, Conte P, Dominici M. MSC and Tumors: Homing, Differentiation, and Secretion Influence Therapeutic Potential. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;130:209-66.
11. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1805(1):105-17.
12. Place AE et al. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment *Breast Cancer Research.* 2011;13(6):227
13. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32(1-2): 303-315.
14. Hu M, Peluffo G, Chen H, Gelman R, Schnitt S, Polyak K. Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3372-7
15. Tsuyada AI, Chow A, Wu J, Somlo G, Chu P, Loera S, Liu T, Li AX, Wu X, Ye W, Chen S, Zhou W, Yu Y, Wang YZ, Ren X, Li H, Scherle P, Kuroki Y, Wang SE. CCL2 mediates crosstalk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 2012;72(11): 2768-79.
16. Nielsen SR, Schmid MC. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9624760.
17. DF Quail and JA Joyce. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11): 1423-1437.
18. Biswas SK1, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol.* 2013;35(5):585-600.
19. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016;18(1):84.
20. DeNardo, David G., et al. "Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy." *Cancer discovery* 1.1 (2011): 54-67.
21. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology.* 2013;138(2):105-115.
22. Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(9):3609.
23. Stabile H, Fionda C, Gismondi A, Santoni A. Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front Immunol.* 2017;8:293.
24. Allinen M, Beroukchim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004;6(1):17-32.
25. Ljubic B, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Sci Rep.* 2013;3:2298.
26. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol.* 2010;184(10):5885-94.



27. Interaction between regulatory T cells and cancer stem cells. Yu XL, Li H, Ren X. *Int J Cancer*. 2012 Oct 1;131(7):1491-8.
28. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity Adriana Albini, Antonino Bruno, Cristina Gallo, Giorgio Pajardi, Douglas M. Noonan, and Katuscia Dallaglio *Connect Tissue Res*. 2015 Sep 3; 56(5): 414–425.
29. Cancer Stem Cells and Macrophages: Implications in Tumor Biology and Therapeutic Strategies. Bruno Sainz, Jr., Emily Carron, Mireia Vallespinós, and Heather L. Machado. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: 9012369.
30. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
31. Lee G, Hall RR 3rd, Ahmed AU. Cancer Stem Cells: Cellular Plasticity, Niche, and its Clinical Relevance. *J Stem Cell Res Ther*. 2016;6(10): 363.
32. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):717-28.
33. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-892.
34. Barabe, F, Kennedy, J.A., Hope, K.J., & Dick. Cancer stem cells: controversies and misconceptions. *J.E.Science*. 2007;316: 600–604
35. Hartwig FP, Nedel F, Collares T, Tarquinio SB, Nör JE, Demarco FF. Oncogenic somatic events in tissue-specific stem cells: a role in cancer recurrence? *Ageing Res Rev*. 2014;13:100–6.
36. Lin CY, Barry-Holson KQ, Allison KH. Breast cancer stem cells: are we ready to go from bench to bedside? *Histopathology*. 2016;68(1):119-37.
37. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
38. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-38.
39. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):260-71.
40. Wang RA, Li ZS, Zhang HZ, Zheng PJ, Li QL, Shi JG, Yan QG, Ye J, Wang JB, Guo Y, Huang XF, Yu YH. Invasive cancers are not necessarily from preformed in situ tumours - an alternative way of carcinogenesis from misplaced stem cells. *J Cell Mol Med*. 2013;17(7):921-6.
41. Gorden BH, Kim JH, Sarver AL, Frantz AM, Breen M, Lindblad-Toh K, O'Brien TD, Sharkey LC, Modiano JE, Dickerson EB. Identification of three molecular and functional subtypes in canine hemangiosarcoma through gene expression profiling and progenitor cell characterization. *Am J Pathol*. 2014;184(4):985-995.
42. Herrera-Gayol A, Jothy S. Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *Exp Mol Pathol*. 1999;66(2):149-56.
43. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol*. 2006;16(2):79-87.
44. Götte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*. 2006;66(21):10233-7.
45. Kida K, Ishikawa T, Yamada A, Shimada K, Narui K, Sugae S, Shimizu D, Tanabe M, Sasaki T, Ichikawa Y, Endo I. Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(2):261-9.
46. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497-512.
47. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555-67.
48. Cariati M, Naderi A, Brown JB, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, Purushotham AD. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2008;122(2):298-304.
49. Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, Forrest NC, Lindeman GJ, Visvader JE. The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res*. 2008;68(19):7711-7.
50. Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*. 2011;71(3):634-9.
51. Brooks MD, Wicha MS. Tumor twitter: cellular communication in the breast cancer stem cell niche. *Cancer Discov*. 2015;5(5):469-71.
52. Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, Quraishi AA, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson AK, Chung S, Luther T, Paholak HJ, Liu S, Hassan KA, Zen Q, Clouthier SG, Wicha MS. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell*. 2012;47(4):570-84.
53. Hosford SR, Miller TW. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2014;7:203-15.



54. Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*. 1992;3(10):1169-80.
55. Chakraborty G, Jain S, Kundu GC. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 2008;68(1):152-61.
56. Matysiak M, Kapka-Skrzypczak L, Jodłowska-Jędrzych B, Kruszewski M. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(4):817-825.
57. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
58. Smith BN, Burton LJ, Henderson V, Randle DD, Morton DJ, Smith BA, Taliaferro-Smith L, Nagappan P, Yates C, Zayzafoon M, Chung LW, Odero-Marah VA. Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. *PLoS One*. 2014;9(8):e104987.
59. Wei H, Fu P, Yao M, Chen Y, Du L. Breast cancer stem cells phenotype and plasma cell-predominant breast cancer independently indicate poor survival. *Pathol Res Pract*. 2016;212(4):294-301.
60. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-892.
61. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2008;11(1):1-15.
62. Al-Ejeh F, Smart CE, Morrison BJ, Chenevix-Trench G, López JA, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis*. 2011 May;32(5):650-8.
63. Christine E. Eyles, Jeremy N. Rich. Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10; 26(17): 2839-2845.
64. Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):210.
65. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):275-84.
66. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, Pavlick A, Gutierrez MC, Renshaw L, Larionov AA, Faratian D, Hilsenbeck SG, Perou CM, Lewis MT, Rosen JM, Chang JC. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13820-5.

NASAL MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SERBIAN POPULATION

J. JOVANOVIĆ¹, D. JEREMIĆ², B. JOVANOVIĆ¹, MAJA VULOVIĆ², P. SAZDANOVIĆ²,
MAJA SAZDANOVIĆ³, NEDA OGNJANOVIĆ², D. STOJADINOVIĆ², KATARINA JEREMIĆ¹,
N. MARKOVIĆ² and IVANA ŽIVANOVIĆ-MAČUŽIĆ²

¹*Clinical Center Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

²*Department of Anatomy and Forensic Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
34000 Kragujevac, Serbia*

³*Department of Histology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia*

Abstract - The aim of this study was to determine the nasal parameters in the population of central Serbia and to compare them with those determined in earlier studies in different populations. The research was conducted on 496 randomly selected persons (262 males and 234 females), aged 18-65 years. The measured parameters were nasal height and nasal breadth and the standard spreading caliper with scale was used for measurements. There were significant differences in the nasal parameters between male and female subjects. The nasal breadth was 34.72 mm in females, and in the male population it was 36.7 mm. The mean values of nasal height were 52.6 mm and 54.32 mm in females and males, respectively. The nasal index in females and males was 66.01 and 67.56, respectively, and the mean value of the nasal index of all respondents was 66.78. After conducting the research it was concluded that the dominant nasal type in the population of the central part of Serbia is leptorrhine. The present study showed the existence of sexual dimorphism in nasal morphology. The data obtained in our study may be useful in anthropological and forensic research, as well as in cosmetic planning and reconstructive surgery.

Key words: Anthropometry, nasal height, nasal breadth, nasal index, nasal type

INTRODUCTION

The prominent characteristics of the human facial profile are lips, nose and chin (Troncoso et al., 2008). The measurement of anatomical parameters of these facial structures is of great importance to anthropology, reconstructive surgery and forensic medicine. The techniques of anthropometry, as a basic tool of biological anthropology, are used for obtaining these data.

The size and the shape of the nose have been used for differentiation of human races, among the

other parameters (Leong and Eccles, 2009). The nasal index, as the ratio between nasal height and nasal width, multiplied by 100 is the most commonly used parameter in nasal anthropometry. It is based on both bony and cartilaginous landmarks, which makes it different from most other anthropological indices (Bhargava and Sharma, 1959). Based on the nasal index, the nose has been classified as leptorrhine or fine ($NI \leq 69.90$), mesorrhine or medium nose ($70.0 \leq NI \leq 84.90$), or platyrrhine or broad ($NI \geq 850$) (Williams et al., 1995). The nose of individuals with a high nasal index is broad and those with a low index have a narrow nose.

The differences between nasal shapes of people from different parts of the world in part are the results of evolutionary adaptation to climate (Davies, 1932; Balaesque et al., 2007). The nasal index has been correlated with average temperature and humidity (Thomson and Duddley Buxton, 1923; Weiner, 1954) and nasal size with oxygen consumption (Hall, 2005). A low nasal index was associated with cold and dry climates, while a high nasal index was associated with hot and moist climates. It has not been confirmed whether differences in the size and the shape of the nose between different ethnic groups influences the different nasal physiology or predilection to sinonasal pathology (Leong and Eccles, 2009).

The aim of this study was to determine the nasal parameters in the population of central Serbia and to compare them with those determined in earlier studies in different populations.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted on 496 randomly selected persons (262 males and 234 females), aged 18-65 years. Measurements were performed at the Institute of Anatomy, Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, from 2007-2012. All subjects were without past and existing craniofacial trauma, without deformity and facial scars. The measurement process was explained to each subject and written permission was obtained from each tested person before measurement.

All measurements were performed in the same way and under the same conditions. The subjects were in a sitting position, in a relaxed condition, with the head in the correct anatomical position (neutral position of the head). All measurements were performed three times and the mean value was taken for further analysis. The measurements were made with a permissible error of 1 mm.

The standard spreading caliper with scale was used for the measurement of nasal parameters.

The differences in mean values of nasal height, nasal breadth and nasal index were tested for statistical significance by independent sample t-test.

Landmark points used in measuring of the parameters were the nasion (n) – the midpoint of the nasofrontal suture and the subnasale (sn) – in the midline, the junction between the lower border of the nasal septum and the cutaneous portion of the upper lip.

The anthropometric measurements taken were nasal height (NH) – distance between nasion (n) and subnasale (sn) and nasal breadth (NB) – distance between the two alae nasi (al).

The nasal breadth (maximum breadth of the nose) was measured at a right angle to the nasal height from ala to ala. The nasal height was measured from nasion to nasospinale.

Nasal index (NI) presents the ratio between nasal breadth (NB) and nasal height (NH) and can be calculated according to the formula of Romo and Abraham (2003):

$$\text{Nasal index (NI)} = \frac{\text{nasal breadth (NB)}}{\text{nasal height (NH)}} \times 100$$

According to the nasal index (NI), the nose was classified as leptorrhine – fine ($\text{NI} \leq 69.90$), mesorrhine – medium ($70.0 \leq \text{NI} \leq 84.90$) or platyrrhine – broad ($\text{NI} \geq 85.0$) (Williams et al., 1995).

RESULTS

The present study provides valuable new data pertaining to the nasal indices and nasal types in the adult Serbian population.

The nasal breadth, as a distance between two alae nasi, was found to be 34.72 mm in females, while in males it was 36.7 mm. The nasal height presents the distance between nasion and subnasale point and the mean values were 52.6 mm and 54.32 mm in females

Table 1. Nasal parameters of the studied population

Parameter	Male	Female	Both Sexes	p value
Nasal height (NH) mm±SD	54.32±3.70	52.6±4.61	53.46±4.28	<0.001*
Nasal breadth (NB) mm±SD	36.7±2.86	34.72±3.38	35.71±3.14	<0.001*
Nasal index (NI)	67.56±6.07	66.01±8.12	66.78±7.24	<0.001*

* Significant difference

Table 2. Frequencies of the categories of nasal type according to nasal index of the studied population

Nose type	Male	Female	Both gender	p value
Leptorrhine	68.32% (179)	87.18% (204)	77.22% (383)	<0.001*
Mesorrhine	29.77% (78)	11.97% (28)	21.37% (106)	<0.001*
Platyrrhine	1.91% (5)	0.85% (2)	1.41% (7)	<0.001*

* Significant difference

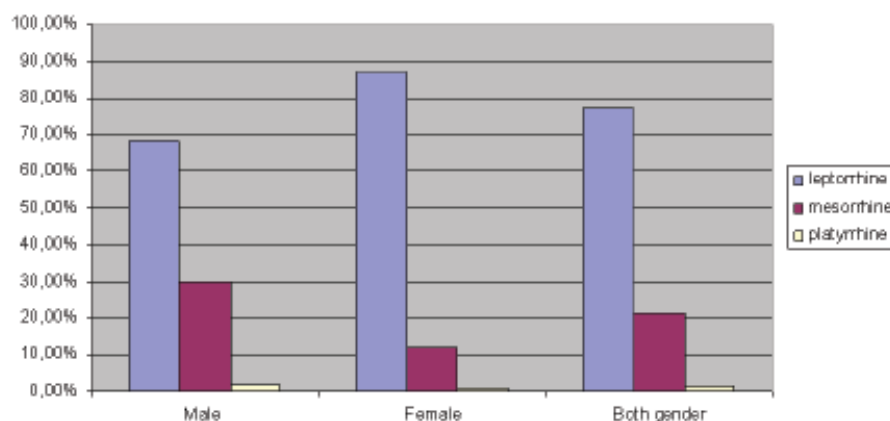


Fig.1. Frequencies of the categories of nasal type according to nasal index of the studied population

and males, respectively. The nasal indices in females and males were found to be 66.01 and 67.56 respectively, and the mean value of the nasal index of all respondents was 66.78 (Table 1). Thus, Serbian males have a significantly higher nasal breadth, nasal height and nasal index than females ($p < 0.001$).

The dominant type of nasal phenotype according to the nasal index was leptorrhine with a frequency of 68.32% in males and 87.18% in females; this was followed by mesorrhine (29.77% in males and

11.97% in females) and platyrrhine (1.91% in males and 0.85% in females). Thus, leptorrhine nasal type predominated among males and females with a frequency of 77.22% (Table 2, Fig. 1).

DISCUSSION

The understanding and concept of beauty are different and individual. However, all would agree that the appearance of the nose (shape and the size) significantly affect the appearance of the whole face.

It also can affect the psychological and social functioning of a person (Borges et al., 1998). Therefore, nose surgery is one of the most common surgical procedures in plastic surgery, because it can change the size and shape of the nose and can be of great importance for improved self-confidence and social functioning.

Esthetic surgery uses knowledge of anatomy and facial esthetics, and a distinct surgical technique is selected for each individual nose. Rhinoplasty is always based on a detailed preoperative analysis. Nasal index is very useful in this analysis. It is also very useful in forensic research as well as in the study of differences among living populations (Daniel, 2003). The number of variations in nasal shape and size is greater than the variations of any other part of the human body (Proetz, 1941). In the planning of reconstructive surgery of the nose it is very important to take into account the type of nose characteristic for a particular race or ethnic group to suit the final outcome with the proportions of the face. Various studies have indicated the great ethnic sensitiveness of nasal index and have shown racial and ethnic differences in nasal index among different populations. Leptorrhine nose type with a nasal index of 69.9 or less is characteristic for the Caucasian race. Africans have a platyrrhine type of nose, with a nasal index of 85.00 and higher, whereas the Caucasoids of Indo-Aryan ancestry have mesorrhine type noses (Gangrade and Babel, 2012).

The mean nasal index observed in this study (66.78) was higher than that observed in the populations of the following countries: Armenia – 63.80, Damascus – 63.26, Lebanon – 63.30 (Daniel, 2003), Montenegrins of Vojvodina-Serbia – 62.93 males, 60.61 females (Pavlica et al., 2007), North America – 64.85, Azerbaijan – 64.25, Bulgaria – 65, Czech Republic – 65.96, Germany – 62.85, Hungary – 65.8, Italy – 56.85, Poland – 64.6, Portugal – 58.35, Slovakia – 62.35, Turkey – 61.45, Iran – 55.65 and Egypt – 60.55 (Farkas et al., 2005).

This index was similar but lower than those observed in Croatians (66.8) and Russians (67.5) (Far-

kas et al., 2005). The nasal index of Greek and German populations according to Farkas et al. (2005) was 62.85, which is lower than in our study, but according to another study this index in the Greek population was 68.49 (Daniel, 2003), and in Germans 71 (Akpa et al., 2003), which was higher than in our study.

The mean nasal index observed in this study (66.78) was lower than those observed in various Nigerian populations (81.86-98.50) (Oladipo et al., 2007, 2008a, 2009, 2010), Nigerian Igbos – 116.70 (Akpa et al., 2003), Nigerian Isokos – 90.97±8.26 (Ese et al., 2011), Nigerian Sindhi – 70.7 (Choudhary and Chowdhary, 2012), Africans – 90-100 (Risley, 1969), African Americans – 79.70 (Porter and Olson, 2003), Indian Negroid (Sudroid) – 84.10, Indo-Aryans – 73.25 (Risley, 1969), Indian Onge males – 87.43, Indian Onge females – 90.07 (Ashok, 2006), Arabs – 74.48 (Daniel, 2003), Indians – 72.4, and Singaporeans – 72.4 (Farkas et al., 2005).

Most Western Europeans are leptorrhine, having long narrow noses with a nasal index of 69.9 or less (Romo and Abraham, 2003), corresponding to the findings in the present study. The Bantu and Bushmen African tribes are platyrrhine with a nasal index of 85.0 and above (Risley, 1969). In the present study, the mean nasal indices, both male and female, were lower than those observed for indigenous Australians with a nasal index of 85.0 and above and with platyrrhine nasal type (Romo and Abraham, 2003). In the present study, the largest number of subjects, according to the nasal index, had leptorrhine noses, corresponding to the findings in the Montenegrins of Vojvodina (Serbia) (Pavlica et al., 2007).

The mean value of the nasal breadth in the studied population (both male and female) was one of the highest among white Europeans. It was higher than the nasal breadth of males in Italy (32.1 mm), Slovakia (33.6 mm), Germany (34 mm), North America (34.7), Poland (35.2 mm), Russia (35.8 mm), Azerbaijan (35.7 mm), Greece (35.7 mm), Slovenia (35.9 mm), Bulgaria (36 mm) and Czech Republic (36.2

mm) (Farkas et al., 2005). It is similar to, but higher than, the measured values of Croatians (36.5 mm) and Portuguese (36.6 mm), and similar but lower than that of the Turkish male population (36.8 mm) (Farkas et al., 2005). The nasal breadth of the Serbian respondents of this study was lower than in the Hungarian population (37.3 mm).

The mean value of nasal breadth in the female population of our study (34.72) was higher than the nasal breadth of European and North American females. It was similar to, but higher than the measured values of females in Czech Republic (33.8 mm) and Azerbaijan (33.8) (Farkas et al., 2005). The nasal breadth of Serbian female respondents in our study was lower than in females from India, Singapore, Thailand and Japan (Farkas et al., 2005).

The mean value of nasal height in the studied male population was 54.32. This was higher than the nasal height of males in North America (53), Slovakia (53.5 mm), Germany (52 mm), Poland (53.7 mm), Russia (51.7 mm) and India (47.2 mm) (Farkas et al., 2005). It is similar to, but higher than the measured values in Bulgarian (54 mm), Czech (54 mm) and Croatian populations (53.8 mm) (Farkas et al., 2005). The nasal height of Serbian males was lower than that of males in Italy (56.2 mm) Azerbaijan (55.9 mm), Greece (55.5 mm) Slovenia (56.2 mm), Hungary (55 mm) and Portugal (59.5 mm) (Farkas et al., 2005).

The mean value of the nasal height in the studied female population was 52.6. It was higher than the nasal height of females in North America (48.9), Slovakia (49.4 mm), Croatia (50 mm), Germany (51.4 mm), Poland (51.2 mm), Russia (50.4 mm), India (43.7) and Egypt (47.4) (Farkas et al., 2005). It is similar to, but greater than the measured values in Italian (52.1 mm), Bulgarian (52.1 mm), Czech (52.1 mm), Azerbaijani (52.3 mm), Slovenian (52 mm) and Hungarian populations (52.5 mm) (Farkas et al., 2005). The nasal height of Serbian female respondents of this study was very similar, but lower than in Greek (52.8 mm) and Portuguese (57.8 mm), Iranian (58.5) and Turkish (55.2) females.

After conducting the research, it was concluded that the dominant nasal type in the population of the central part of Serbia is leptorrhine. The present study confirmed the existence of sexual dimorphism in nasal morphology. The data obtained in our study may be useful in anthropological and forensic research, as well as in cosmetic planning and reconstructive surgery.

REFERENCES

- Akpa, A.O.C., Ugwu, C. and S.O. Maliki (2003). Morphometric study of the nasal parameters in Nigerian Igbos. *J. Exp. Clin. Anat.* 2(2), 24-25.
- Ashok, K.P. (2006). Cephalo-facial variation among Onges. *Anthropologist* 8(4), 245-249.
- Balaresque, P.L., Ballereau S.J. and M.A. Jobling (2007). Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation. *Hum. Mol. Gen.* 16, R134-R139.
- Bhargava, I. and J.C. Sharma (1959). The Nose in Relation to Head and Face. An Anthropometric Study. *Indian Journal of Otolaryngology* 11(4), 213-218.
- Borges, D.P., Dinis, M. and A. Gomes (1998). Psychosocial Consequences of Nasal Aesthetic and Functional Surgery: A Controlled Prospective Study in an ENT Setting. *Rhinology* 36, 32-38.
- Choudhary, A. and D.S. Chowdhary (2012). Comparative anthropometric study of nasal parameters between two ethnic groups of Rajasthan State. *Int. J. Med. Public Health* 2(2), 46-48.
- Daniel, R.K. (2003). Hispanic rhinoplasty in the United States, with emphasis on the Mexican American nose. *Plast. Reconstr. Surg.* 112(1), 244-56, discussion pp. 257-258.
- Davies, A. (1932). Man's nasal index in relation to climate. *J.R. Anthropol. Ins. GB Irel.* 29, 8-14.
- Ese, A., Mabel, O.E., Dennis, E.O.E. and A. Ogheneyeseno (2011). Anthropometric study of the nasal parameters of the Isokos in Delta State of Nigeria. *Annals of Biological Research* 2(6), 408-413.
- Farkas, L.G., Katić, M.J. and C.R. Forrest (2005). International Anthropometric Study of Facial Morphology in Various Ethnic Groups/Races. *The Journal of craniofacial surgery* 16(4), 615-646.
- Gangrade, P.R. and H. Babael (2012). Anthropometric study of the nasal index of the Bheel - Meena tribe of Southern Rajasthan. *Int. J. Cur. Res. Rev.* 4(19), 88-91.

- Hall R.L. (2005). Energetics of nose and mouth breathing, body size, body composition and nose volume in young adult males and females. *Am. J. Hum. Biol.* 17, 321-330.
- Leong, S.C. and R. Eccles (2009). A synaptic review of the nasal index and the significance of the shape and size of the nose in rhinology. *Clin. Otolaryngol.* 34, 191-198.
- Oladipo, G.S., Didia, B.C., Okoh, P.D. and J.S. Hart (2008a). Sexual dimorphism in facial dimensions of adult jaw. *J. Expt. and Clin. Anat.* 7(2), 10-14.
- Oladipo, G.S., Eroje, M.A. and H.B. Fahwehinmi (2009). Anthropometric comparison of nasal indices between Andoni and Okrika tribes of Rivers State, Nigeria. *Int. J. Med. Med. Sci.* 1(4), 135-137.
- Oladipo, G.S., Olabiyi, A.O., Oremosu, A.A. and C.C. Noronha (2007). Nasal indices among major ethnic groups in southern Nigeria. *Scientific Research and Essay* 2(1), 20-22.
- Oladipo, G.S., Oyakhire, M.O. and A.A. Ugboma Henry (2010). Anthropometric studies of nasal indices of the Ekpeye and Ikwerre ethnic groups in Nigeria. *Asian J. Med. Sci.* 2(4), 167-169.
- Pavlica, T., Božić-Krstić, V. and R. Rakić (2007). Anthropological characteristics of Montenegrins living in Vojvodina. *Glasnik Antropološkog društva Jugoslavije* 42, 167-177.
- Porter, J.P. and K.L. Olson (2003). Analysis of the African American female nose. *Plastic Reconstruct. Surg.* 111(2), 627-628.
- Proetz, A.W. (1941). *Essays on the applied physiology of the nose.* Annals Publishing Co., St. Louis, U.S.A.
- Risley, H.H. (1969). *The people of India.* Oriental Books Reprint Corporation, Delhi, 395-399.
- Romo, T. and M.T. Abraham (2003). The ethnic nose. *Facial Plastic Surg.* 19(3), 269-278.
- Thompson, A. and L. Dudley Buxton (1923). Man's nasal index in relation to certain climatic conditions. *J. R. Anthropol. Inst. GB. Irel.* 53, 99-122.
- Troncoso, P.J.A, Suazo, G.I.C, Cantin L.M. and M.D.A. Zavando (2008). Sexual dimorphism in the nose morphotype in adult Chilean. *Int. J. Morphol.* 26 (3), 537-542.
- Weiner J.S (1954). Nose shape and climate. *Am. J. Phys. Anthropol.* 12, 615-618.
- Williams, P, Dyson, M., Dussak, J.E., Bannister, L.H., Berry, M.M., Collins, P and M.W.J. Ferguson (1995). Skeletal system. In: *Gray's Anatomy.* 38th Edn, 607-612. Elbs with Churchill Livingstone, London