



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Дејан Т. Симић

**ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСА
ПАЛАДИЈУМА(II) СА ДЕРИВАТИМА ТИАЗОЛА КАО
ЛИГАНДИМА НА ЋЕЛИЈАМА ТУМОРА ПРОСТАТЕ *IN*
*VITRO***

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Dejan T. Simić

**ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI KOMPLEKSA
PALADIJUMA(II) SA DERIVATIMA TIAZOLA KAO
LIGANDIMA NA ĆELIJAMA TUMORA PROSTATE *IN*
*VITRO***

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Dejan T. Simic

**INVESTIGATION OF CYTOTOXICITY OF PALLADIUM(II)
COMPLEXES WITH THIAZOLE DERIVATIVES AS
LIGANDS ON PROSTATE TUMOR CELLS *IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I Аутор
Име и презиме: Дејан Т. Симић
Датум и место рођења: 27.04.1975. године, Врање
Садашње запослење: Клиника за урологију, Војномедицинска академија, Београд
II Докторска дисертација
Наслов: Испитивање цитотоксичности комплекса паладијума(II) са дериватима тиазола као лигандима на ћелијама тумора простате <i>in vitro</i>
Број страница: 83
Број слика: 4 слике, 5 табела, 15 графикана
Број библиографских података: 162
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: доц. др Петар Чановић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Биохемија</i>
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 14.05.2019. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-584/18, 10.07.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Слободан Новокмет, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска биотехнологија</i>, председник2. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i>, члан3. Проф. др Наташа Петронијевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Медицинска и клиничка биохемија</i>, члан4. Проф. др Берислав Векић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Хирургија</i>, члан5. Доц. др Ивана Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Биохемија</i>, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
Датум одбране дисертације:

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

I Autor
Ime i prezime: Dejan T. Simić
Datum i mesto rođenja: 27.04.1975 godine, Vranje
Sadašnje zaposlenje: Klinika za urologiju, Vojnomedicinska akademija
II Doktorska disertacija
Naslov: Ispitivanje citotoksičnosti kompleksa paladijuma(II) sa derivatima tiazola kao ligandima na ćelijama tumora prostate <i>in vitro</i>
Broj stranica: 83
Broj slika: 4 slike, 5 tabela, 15 grafikona
Broj bibliografskih podataka: 162
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: doc. dr Petar Čanović, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast <i>Biohemija</i>
III Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 14.05.2019. godine
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-584/18, 10.07.2019. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. Prof. dr Slobodan Novokmet , redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska biotehnologija, predsednik
2. Prof. dr Marija Milovanović , vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast <i>Mikrobiologija i imunologija</i> , član
3. Prof. dr Nataša Petronijević , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast <i>Medicinska i klinička biohemija</i> , član
4. Prof. dr Berislav Vekić , vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast <i>Hirurgija</i> , član
5. Doc. Dr Ivana Nikolić , docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast <i>Biohemija</i> , član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
Datum odbrane disertacije:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

I Author
Name and surname: Dejan T. Simic
Date and place of birth: 27.04.1975. Vranje
Current employment: Department of Urology, Military Medical Academy, Belgrade
II Doctoral Dissertation
Title: Investigation of cytotoxicity of palladium(II) complexes with thiazole derivatives as ligands on prostate tumor cells <i>in vitro</i>
No. of pages: 83
No. of images: 4 pictures, 5 tables, 15 charts
No. of bibliographic data: 162
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine (Clinical and experimental surgery)
Mentor: doc. dr Petar Canovic, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, narrow scientific field of <i>Biochemistry</i>
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 14.05.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-584/18, 10.07.2019.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none">1. Prof. dr Slobodan Novokmet, full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of <i>Pharmaceutical biotechnology</i>, president2. Prof. dr Marija Milovanovic, associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of <i>Microbiology and Immunology</i>, member3. Prof. dr Nataša Petronijevic, full professor of Faculty of Medicine, University of Belgrade for the narrow scientific field of <i>Medical and clinical biochemistry</i>, member4. Prof. dr Berislav Vekic, associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of <i>Surgery</i>, member5. Doc. dr Ivana Nikolic, assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of <i>Biochemistry</i>, member
Commission for evaluation and defense of doctoral dissertation:
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Биолошки активне супстанце које у својој структури садрже метале су будућност антитуморске терапије. Комплекси метала у зависности од своје структуре и хемијских особина показују мањи или већи степен антитуморског ефекта на различите испитиване ћелијске линије.

Супстанце које у својој структури садрже метал паладијум су показале веома јако антитуморско дејство на цисплатин-резистентне туморске ћелијске линије. Сврха, односно циљ наше студије је био да детаљно тестирамо биолошки ефекат пет *Pd(II)* комплекса (обележених као *C1-C5*) и одговарајућих лиганата (обележених као *L1-L5*), на туморске ћелије хуманог карцинома простате *PC-3* и *DU-145* као и на ћелијској линији малигно неизмењених фибробласта *MRC-5*.

Као методе за одређивање биолошке активности *Pd(II)* комплекса и одговарајућих лиганата користили смо *MTT* тест, *Annexin V/PI* тест, анализу ћелијског циклуса применом *PI* бојења и анализу кључних протеина апоптозе.

Обрадом и детаљном анализом добијених резултата показано је да сви тестирани *Pd(II)* комплекси демонстрирају веома јак и антитуморски ефекат на *PC-3* и *DU-145* ћелијске линије *in vitro*. Такође, претходно поменути комплекси су испољили веома слаб антитуморски ефекат на малигно неизмењене фибробласте *MRC-5*, чиме је јасно показана висока селективност тестираних супстанци. Испитивани лиганди *L1-L5* су показали веома слаб антитуморски ефекат на свим тестираним ћелијским линијама, чиме је јасно доказана кључна улога паладијума.

Даље, тестирани, *Pd(II)* комплекси смањују вијабилност *PC-3* и *DU-145* на два начина, индуковањем процеса апоптозе или застојем у различитим фазама ћелијског циклуса. Прецизније, испитивани *Pd(II)* комплекси индукују унутрашњи митохондријални пут, повећавајући релатисни однос *Bax/Bcl-2*, а затим индукујући активацију каспазе-3.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: каспазом индукована ћелијска смрт, онкогенеза, комплекси паладијума, карцином простате, ћелијски циклус.

ABSTRACT

Biologically active substances that contain metals in their structure are the future of antitumor therapy. Depending on their structure and chemical properties, metal complexes show a lower or higher degree of antitumor effect on the different tested cell lines.

Substances that contain palladium metal in their structure have shown a very strong antitumor effect on cisplatin-resistant tumor cell lines. Our study aimed to test in detail the biological effect of five Pd(II) complexes (marked as *C1-C5*) and the corresponding ligands (marked as *L1-L5*) on *PC-3* and *DU-145* human prostate cancer tumor cells, as well as on the *MRC-5* fibroblast cell line without malignant changes.

As methods for determining the biological activities of Pd(II) complexes and corresponding ligands, we used the MTT test, Annexin V/PI test, cell cycle analysis using PI staining, and analysis of key apoptotic proteins.

Results showed that all tested Pd(II) complexes demonstrated a very strong antitumor effect on *PC-3* and *DU-145* cell lines *in vitro*. Also, the previously mentioned complexes exhibited insignificant antitumor effects on non-cancerous *MRC-5* fibroblasts, which demonstrated the high selectivity of the tested substances. The tested ligands *L1-L5* showed an insignificant antitumor effect on all tested cell lines, thus clearly proving the key role of palladium.

Furthermore, the tested Pd(II) complexes reduce the viability of *PC-3* and *DU-145* in two ways, by inducing the process of apoptosis or by keeping them in different phases of the cell cycle. More precisely, the tested Pd(II) complexes induce the inner mitochondrial pathway of apoptosis, increasing the relative ratio of *Bax/Bcl-2* proteins, and then inducing the activation of caspase-3.

KEYWORDS: caspase-induced cell death, oncogenesis, palladium complexes, prostate cancer, cell cycle.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. ОНКОГЕНЕЗА	2
1.2. КАРЦИНОМ ПРОСТАТЕ	4
1.3. ПРОГРАМИРАНА ЋЕЛИЈСКА СМРТ	5
1.4. АПОПТОЗА	6
1.4.1.МЕХАНИЗАМ АПОПТОЗЕ	6
1.4.2 СПОЉАШЊИ ПУТ АПОПТОЗЕ	6
1.4.3. УНУТРАШЊИ ПУТ АПОПТОЗЕ	8
1.4.4. КАСПАЗЕ	10
1.5. ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС	11
1.5.1. G1/S ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА	11
1.5.2. G2/M ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА	12
1.6. ЛЕКОВИ КОЈИ СЕ КОРИСТЕ У ХЕМИОТЕРАПИЈИ МАЛИГНИТЕТА.....	13
1.7. КОМПЛЕКСИ МЕТАЛА У МЕДИЦИНИ	14
1.7.1. ЦИСПЛАТИНА	15
1.7.2. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА	16
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ.....	17
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	18
3.1. ТЕСТИРАНА ЈЕДИЊЕЊА.....	19
3.2. ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА	22
3.3 МТТ ТЕСТ.....	23
3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕЛАТИВНОГ ОДНОСА ЋЕЛИЈА КОЈЕ СЕ НАЛАЗЕ У АПОПТОЗИ И НЕКРОЗИ (<i>Annexin V/PI</i> тест)	24
3.5. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА	25
3.6. АНАЛИЗА КЉУЧНИХ ПРОТЕИНА АПОПТОЗЕ	26
3.7. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА И ПРЕЗЕНТАЦИЈА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА..	27
4. РЕЗУЛТАТИ.....	28
4.1 АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ЛИГАНАДА И ЦИСПЛАТИНЕ НА СТОПУ ПРЕЖИВЉАВАЊА (ВИЈАБИЛНОСТ) ЋЕЛИЈА ЕПИТЕЛНОГ АДЕНОКАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ <i>PC-3</i>	28
4.2. ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ОДГОВАРАЈУЋИХ ЛИГАНАДА И ЦИСПЛАТИНЕ НА СТОПУ ПРЕЖИВЉАВАЊА ЋЕЛИЈА ЕПИТЕЛНОГ АДЕНОКАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ <i>DU-145</i>	37

4.3. ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ОДГОВАРАЈУЋИХ ЛИГАНАДА И ЦИСПЛАТИНЕ НА СТОПУ ПРЕЖИВЉАВАЊА ЋЕЛИЈА МАЛИГНО НЕИЗМЕЊЕНИХ ФИБРОБЛАСТА <i>MRC-5</i>	46
5. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ ПРОЦЕС АПОПТОЗЕ МАЛИГНИХ ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ	52
5.1. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ АПОПТОЗУ ЋЕЛИЈА АДЕНОКАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ <i>PC-3</i>	52
5.2. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ АПОПТОЗУ ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ <i>DU-145</i>	55
6. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА УТИЧУ НА ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС ИСПИТИВАНИХ ТУМОРСКИХ ЋЕЛИЈА.....	57
6.1. ЕФЕКАТ ИСПИТИВАНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА НА ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС <i>PC-3</i> ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ	57
6.2. ЕФЕКАТ ИСПИТИВАНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА НА ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС <i>DU-145</i> ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ.....	60
7. ИСПИТИВАНИ КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ ПРОЦЕС ПРОГРАМИРАНЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ АКТИВАЦИЈОМ УНУТРАШЊЕГ МИТОХОНДРИЈАЛНОГ ПУТА.....	62
8. ДИСКУСИЈА.....	67
9. ЗАКЉУЧАК.....	74
10. РЕФЕРЕНЦЕ	75

1. УВОД

Појам „канцер“ у медицини обухвата више од стотину болести и не постоји орган код кога се малигнитет не може развити (1). Термин „канцер“ је дакле заједнички појам за све малигне неоплазме (2). Сви малигнитети, односно малигно трансформисане ћелије без обзира на примарну локализацију имају одређене заједничке особине (1, 2). Малигно трансформисане ћелије карактерише неконтролисан раст и подела, при чему долази до поремећаја ћелијских механизма који су одговорни за раст и пролиферацију ћелија (1-3). Осим тога, постоји и неспособност малигнућелија да врше своје специјализоване функције. Такође, за туморске ћелије је карактеристично да су слабо диферентоване за разлику од здравих, малигно неизмењених ћелија (3, 4). Малигно трансформисане ћелије могу инфилтрирати околно ткиво, вршити деструкцију и тиме нарушити нормалну физиолошку функцију ткива (1, 3). Туморске ћелије, за разлику од малигно неизмењених ћелија, карактерише веома слаб међусобни контакт, што омогућава ширење ових ћелија и на друге органе (2, 3). Све претходно наведене карактеристике малигнућелија су последица потпуно промењеног ћелијског метаболизма у односу на малигно неизмењене ћелије.

Карциноми представљају други по реду узрок смрти када говоримо о земљама у развоју, након кардиоваскуларних болести (5). Узрок лежи у томе што врло често нема раних симптома код оболелих, као и ране дијагнозе, а чак и након адекватне и агресивне терапије понекад није могуће потпуно излечење (5, 6). Из наведених разлога, можемо јасно закључити да је за успешно лечење различитих типова карцинома значајно што раније дијагностиковање тумора као и адекватна терапијска мера (6). Стога, веома су актуелна истраживања у пољу ране дијагнозе малигнитета као и терапије свих облика карцинома.

Према најновијим објављеним и публикованим извештајима које објављује Национални институт за малигне туморе (енг. *NCI, National Cancer Institute*), у САД-у (Сједињене Америчке Државе) је када говоримо о 2020. години код око 2 милиона људи дијагностикован неки тип малигнитета, а око 606.000 људи је преминуло од истог. Најчешће дијагностиковани малигнитети су карциноми дојке, плућа, простате, колоне и ректума. Инциденца, број новооткривених пацијената са карциномом је око 442,4 на 100.000 жена и мушкараца годишње, а подаци датирају од 2013-2017. године. Осим тога, стопа морталитета износи 158,3 на 100.000 особа, а подаци датирају од 2013-2017. године. Такође, оно што представља веома лошу прогнозу је процена да ће код око 40% одраслих током неког животног доба сигурно бити дијагностикован одеђени тип малигнитета (7).

Значајан пораст инциденце као и повећан степен морталитета пацијената код којих је дијагностикован неки тип карцинома, забележен је и у Србији, а подаци датирају од 1999. до 2009. године. Само у 2008. години Србија је имала знатно већи степен морталитета код оболелих од карцинома у односу на земље чланице Европске Уније. Такође, 2008. године у Србији само је инциденца карцинома простате била испод европског просека (8).

Из свега наведеног, можемо јасно закључити да су малигнитети веома озбиљан здравствени проблем и да је од фундаменталног значаја разумети сам процес канцерогенезе, а све у циљу ране дијагнозе као и проналаска адекватне селективне терапије која ће довести до потпуног излечења.

1.1. ОНКОГЕНЕЗА

Онкогенеза је веома комплексан процес, који најчешће настаје услед оштећења у молекулу ДНК, односно поремећена је ћелијска пролиферација, диференцијација као и ћелијско преживљавање (9, 10). Битно је напоменути да промене у структури молекула ДНК представљају заправо мутације, а оне могу да настану током процеса репликације или услед губитка механизма поправке ДНК (9, 11). Да би ћелија имала малигну трансформацију, неопходно је да прође више стадијума као што су иницијација, промоција и прогресија (11, 12). Процес који називамо иницијација је иреверзибилан у којем се од једне моноклоналне малигно трансформисане ћелије развијају клонови туморских ћелија (11, 12). Промоција је реверзибилан процес и зависи од интензитета деловања канцерогених фактора (12, 13). Прогресија је иреверзибилан процес кога карактеришу стварање примарног локалног тумора као и јасно уочљиве геномске промене (13). Многи аутори наводе да четврти стадијум заправо представља процес метастазирања, који се односи на ширење туморских ћелија далеко од места настанка примарног тумора (13, 14).

Фактори који доводе до малигне трансформације ћелија могу бити потпуни и непотпуни (14). Потпуни фактори обухватају све факторе који могу довести до развоја сва три стадијума у малигној трансформацији ћелије, иницијације, промоције и прогресије. Непотпуни фактори најчешће узрокују један од претходно наведена три стадијума (14, 15). У факторе за настанак карцинома убрајамо различите врсте зрачења, разне хемијске канцерогене компоненте као и онкогене вирусе (14-16).

Данас је познато да ћелије улазе у процес малигне трансформације услед прекомерне активације гена, чија је улога у промоцији ћелијске деобе (17-19). Такође, малигна трансформација је могућа и услед иреверзибилног губитка функције гена чија је улога у спречавању раста саме ћелије (16-22).

Међу првим идентификованим онкогенима јесу *ras* онкогени. У физиолошким условима активација *Ras* протеина је есенцијална за пролиферацију и диференцијацију различитих типова ћелија (23, 24). Трансформација и настанак *ras* онкогена је последица тачкасте мутације у *ras* протоонкогену. Тачкаста мутација у *ras* протоонкогену резултира појачаном синтезом *Ras* протеина који у сталном, активном облику доводе до неконтролисане и појачане ћелијске пролиферације (18, 23). Мутирани *ras* онкоген је детектован код различитих типова малигнитета, неуробластома, акутне мијелоидне леукемије и колоректалног карцинома (18).

Протоонкоген *c-myc* и његов генски продукт *p62* су од есенцијалног значаја за репликацију ДНК-а молекула као и за процес транскрипције (18). Прекомерна активација и експресија *c-myc* онкогена је повезана са В и Т лимфомом, леукемијама, саркомом и ендотелиомом (18, 25). До појачане експресије као и трансформације *c-myc* протоонкогена у *c-myc* онкоген долази услед хромозомске транслокације гена (25).

Када говоримо о хроничној мијелоидној леукемији од есенцијалног је значаја транслокација *abl* протоонкогена са хромозома 9 на хромозом 22 (9:22). Уколико дође до претходно поменуте транслокације настаће фузија гена *abl* са геном *bcr*. Настали фузијски протеин *Bcr/Abl* има кључну улогу у малигној трансформацији ћелија (26).

Тумор-супресор гени имају кључну улогу у спречавању неконтролисаног раста и диференцијације малигнућ ћелија (27, 28). Када коначно настане иреверзибилни губитак активности тумор-супресор гена, доћи ће до неконтролисаног раста и диференцијације малигно трансформисане ћелије, уз немогућност репарације грешака у грађи молекула ДНК (29, 30). Тумор-супресор гени као што су *p53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *RBI*, *BRCA-1*, *BRCA-*

2 су есенцијално битни из разлога што је њихова улога да „чувају” геном ћелија и онемогуће малигну трансформацију ћелија (31, 32).

Веома често детектован „оштећен” тумор-супресорски ген код солидних тумора јесте *p53* ген који је локализован на хромозому 17q. Његов протеински продукт *p53* има фундаменталну улогу у везивању за ДНК ћелија, што доводи до регулације регулаторних тачака у процесу ћелијског циклуса. Све ово води ка заустављању ћелијског циклуса и следствене активације протеина који даље активирају процес програмиране ћелијске смрти, апоптозе (33). Стога, мутација *p53* гена као и смањена концентрација *p53* протеина може довести неконтролисаног раста и диференцијације ћелија (33, 34). Код карцинома колона детектована је делеција у једном *p53* алелу и тачкаста мутација у другом алелу. Такође, код карцинома дојке је врло често присутна делеција *p53* гена (35).

Ген *RB1* кодира синтезу протеина *pRB*, а овај протеин може се везати за транскрипционе факторе, попут *E2F* и на тај начин се може зауставити прогресија ћелијског циклуса у *S* фази (36). Из овога можемо јасно закључити да је тумор-супресор *RB1*, заправо ген који иреверзибилно спречава синтезу молекула ДНК. Стога, недвосмислено је доказано да услед мутације *RB1* гена може доћи до развоја ретинобластома и других типова карцинома (35, 37).

Два генска локуса *BRCA-1* и *BRCA-2* су идентификована на хромозому 17q21 и хромозому 13q12 (38, 39). Мутације у претходно наведеним тумор-супресор генима могу довести до развоја карцинома дојке (39, 40). У прилог томе нам говоре чињенице да у особа код којих су утврђене мутације *BRCA-1* гена ризик за развој карцинома дојке већи је од 80%, док је ризик за настанак карцинома јајника већи за 30-60% до 80. године живота (39-41). Такође, у особа код којих су јасно детектоване мутације *BRCA-2* гена ризик за развој карцинома дојке већи је од 60% до 70. године живота (39-41).

У процесу канцерогенезе сматра се да значајну улогу могу имати различити типови вируса (42). Студије су јасно показале да ретровируси, који припадају РНК вирусима могу довести до развоја малигнитета код животиња, али је њихова улога значајно мања у малигној трансформацији и патогенези хуманих малигнитета. Такође, познато је да ретровирус, Хумани-Т ћелијски лимфотропни вирус тип I (енг. *HTLV, Human T-lymphotropic virus*) је један од најзначајнијих узрочника леукемије и Т ћелијског лимфома код одраслих (42, 43). У патогенези хуманих малигнитета значајно већу улогу имају ДНК вируси у односу на претходно поменуте РНК вирусе. У настанку и развоју карцинома цервикса кључну улогу имају хумани папилома вируси (енг. *human papillomavirus, HPV*) посебно тип 16 и 18 (44). Такође, када говоримо о хепатоцелуларном карциному познато је да су у етиологији овог малигнитета укључени вируси хепатитиса *B* и *C* (45). Даље, *Epstein-Barrov* вирус, који је узрочник инфективне мононуклеозе, код одраслих може да узрокује *Burkittov* лимфом (46).

Осим јасно доказаних промена у експресији гена, метаболизам туморских ћелија обухвата квалитативне и квантитативне разлике у односу на малигно неизмењене ћелије.

Како би дошло до самог раста и диференцијације малигно трансформисаних ћелија, неопходна је појачана синтеза нуклеотида, односно молекула ДНК у односу да малигно неизмењене ћелије (47, 48). Такође, код туморских ћелија значајно је повећана синтеза РНК молекула, јављају се квалитативне промене у мРНК и синтетишу се онкофетални протеини (49). Метаболизам канцерских ћелија подразумева и појачану продукцију протеина као и појачано отпуштање протеолитичких ензима (50, 51). За процесе раста, поделе и диференцијације, туморским ћелијама је такође неопходна велика количина енергије (52). Стога, код малигно измењених ћелија јако је појачана

анаеробна гликолиза (52, 53). Процесом анаеробне гликолизе ствара се повећана количина лактата, што за последицу има стварања киселе средине односно ацидозе у канцерским ћелијама (52-54). Други метаболички пут глукозе, хексозо-монофостатни пут је такође интензиван и појачан код туморских ћелија као и активност самог регулаторног ензима овог процеса глукозо-6 фосфат дехидрогеназе, а све у циљу повећаног стварања пентоза за синтезу молекула ДНК (55). Малигне ћелије такође повећавају експресију транспортера за глукозу, *GLUT 1*, у циљу добијања адекватне количине енергије за своје метаболичке процесе (56).

Врло битна карактеристика малигно измењених ћелија је смањена адхезивност услед доказаног недостатка фибронектина и гликозил трансфераза (57). Овом чињеницом се објашњава одвајање појединачних канцерских ћелија из примарног тумора и последичног стварања метастаза (57-59). Како би се развила метастаза довољно је да само једна канцерска ћелија доспе у други орган или део тела (59).

Можемо недвосмислено закључити да кључни узрок морталитета и морбидитета код пацијената са дијагностикованим карциномом су управо метастазе (60).

1.2. КАРЦИНОМ ПРОСТАТЕ

Карцином простате, заједно са бронхопулмоналним и колоректалним карциномом спада у три најчешћа дијагностикована тумора код мушкараца у свету (7). Такође, карцином простате представља други по реду узрок смрти код мушкараца оболелих од различитих типова карцинома у свету (7, 61, 62). Инциденца карцинома простате је висока, посебно у развијеним земљама (7, 63). У Европској Унији представља најчешће дијагностиковани тип карцинома код мушкараца, док у Сједињеним Америчким Државама представља други по реду најчешће дијагностиковани карцином код мушкараца (63).

Постоји више фактора који утичу на повећање ризика од појаве карцинома простате. Студије су недвосмислено показале да инциденца и морталитет од карцинома простате расту прогресивно са повећањем броја година, односно процесом старења (63, 64). У прилог томе нам говори да од укупног броја мушкараца оболелих од карцинома простате, на мушкарце од 35 до 45 година отпада само 0,6% (63-65). Прецизније, највећи број пацијената код којих је дијагностикован карцином простате је у седмој или осмој деценији живота (65). Такође, студије су показале да се карцином простате чешће дијагностикује код Афроамериканаца и има лошију прогнозу (66). У развоју карцинома простате веома је битан генетски фактор. Повећан је ризик од појаве карцинома простате код мушкараца чији су блиски сродници доказано боловали од ове болести (67). Такође, постоји позитивна корелација између настанка карцинома простате и повећаног уношења исхраном протеина и масти животињског порекла (68, 69). Повећан је ризик од развоја карцинома простате код неких занимања, као што су рад у индустрији хемикалија, лекова итд (69).

Карцином простате, слично као и остали типови малигнитета је асимптоматски у својој раној (почетној) фази, најчешће се пацијенти јављају лекару када дође до субвезикалне опструкције (70). Врло је битна чињеница да се велики број пацијената код којих постоји карцином простате дијагностикује тек у метастатској фази болести (70, 71). Стога, симптоми који су повезани са метастазама карцинома простате као што су болови у костима и патолошке фрактуре такође могу упутити пацијента лекару (70, 72).

Основни прегледи који се користе у циљу прецизне дијагнозе карцинома простате су ректални преглед, ултразвучни преглед абдомена, бешике, простате као и одређивање вредности PSA (70, 73). Кључну улогу у дефинитивној дијагнози карцинома простате представља биопсија простате (70, 73, 74).

Лечење карцинома простате зависи од више фактора који обухватају стадијум саме болести, старост и опште стање болесника (70). Локализован карцином простате се лечи хируршки, циљ је уклањање целокупног ткива простате, ради се радикална простатектомија (70, 75). Код старијих пацијената уколико је болест локализована спроводи се радикална зрачна терапија (70, 73). Уколико постоје метастазе сврха лечења је да се даље спречи даља пропација болести. Из тог разлога у терапији користимо хормонску сензитивност карцинома простате (70). Прецизније, у терапији карцинома простате се користе антиандрогени који се везују за андрогене рецепторе, смањујући на тај начин ефекат хормона тестостерона (73). Након дуготрајне терапије антиандрогенима, може се јавити хормонска резистенција, губи се хормонска сензитивност малигнућ хелија, па се стога могу у терапији користити цитостатици али је оно што је веома битна чињеница јесте да је ефекат веома слаб и краткотрајан (70).

Стога циљ нашег истраживања је био развој потенцијалних цитостатика који у својој структури садрже метал паладијум и испитивање њихове потенцијане биолошке активности на туморске ћелије карцинома простате.

1.3. ПРОГРАМИРАНА ЋЕЛИЈСКА СМРТ

Како би се одржала хомеостаза у организму здравог човека, неопходно је да постоји јасна и прецизно контролисана равнотежа између стварања нових и смрти старих ћелија (20, 76). До смрти ћелија може доћи када теломеразе престану да обављају своју есенцијалну улогу у процесу репликације ДНК молекула. Такође, до смрти ћелија може доћи и услед хипоксије, оксидативног стреса, након инфекције вирусом или другим унутарћелијским патогеном (14).

Прецизно контролисани процеси који учествују у одржавању равнотеже између стварања нових и смрти старих ћелија су апоптоза, аутоафгија и некроза (62).

Процес апоптозе је први пут детаљно описан од стране Кар и сарадника. Јасно је дефинисано да процес апоптозе карактерише смањење површине ћелија, фрагментација једра, протузије на плазма мембрани и на крају формирање апоптотичних телашца (77).

Са друге стране аутофагија је процес који се карактерише стварањем аутофагозома, структура које су сачињене из јасно дефинисане мембране са два слоја, која јасно обухвата цитоплазму и у склопу тога органеле. Уколико дође до недостатка хранљивих материја, аутофагија је есенцијални и фундаментални процес у омогућавању да ћелија преживи (78).

Некроза представља патолошки процес услед чега долази до бубрења ћелија, губи се функција унутарћелијских органела и на крају долази до лизе ћелија. Најчешће је некроза ћелија последица исхемије, инфекција, хемијске или физичке повреде (79).

1.4. АПОПТОЗА

Апоптоза представља посебан облик програмиране ћелијске смрти, а сам апоптотични процес може се активирати унутарћелијским или ванћелијским сигнаlima. Када дође до активације процеса апоптозе, истовремено долази до активације одређене фамилије протеаза које називамо каспазе. Од великог је значаја чињеница да услед активације процеса апоптозе не долази до имунског као и запаљенског одговора (80).

Уколико ћелија активира процес апоптозе, долази прво до губитка контакта са околним ћелијама и смањује се површина саме ћелије. Услед кондензације хроматина настаје пикноза, на ћелијској мембрани се формирају протузије, долази до последичног фрагментисања једра и на крају формирања апоптотских телашаца. Када говоримо о ћелијама које уклањају апоптотска телашца важно је напоменути да не продукују цитокине који су медијатори инфламаторног процеса, стога врло је јасно да не долази до инфламаторне реакције (80, 81).

1.4.1. МЕХАНИЗАМ АПОПТОЗЕ

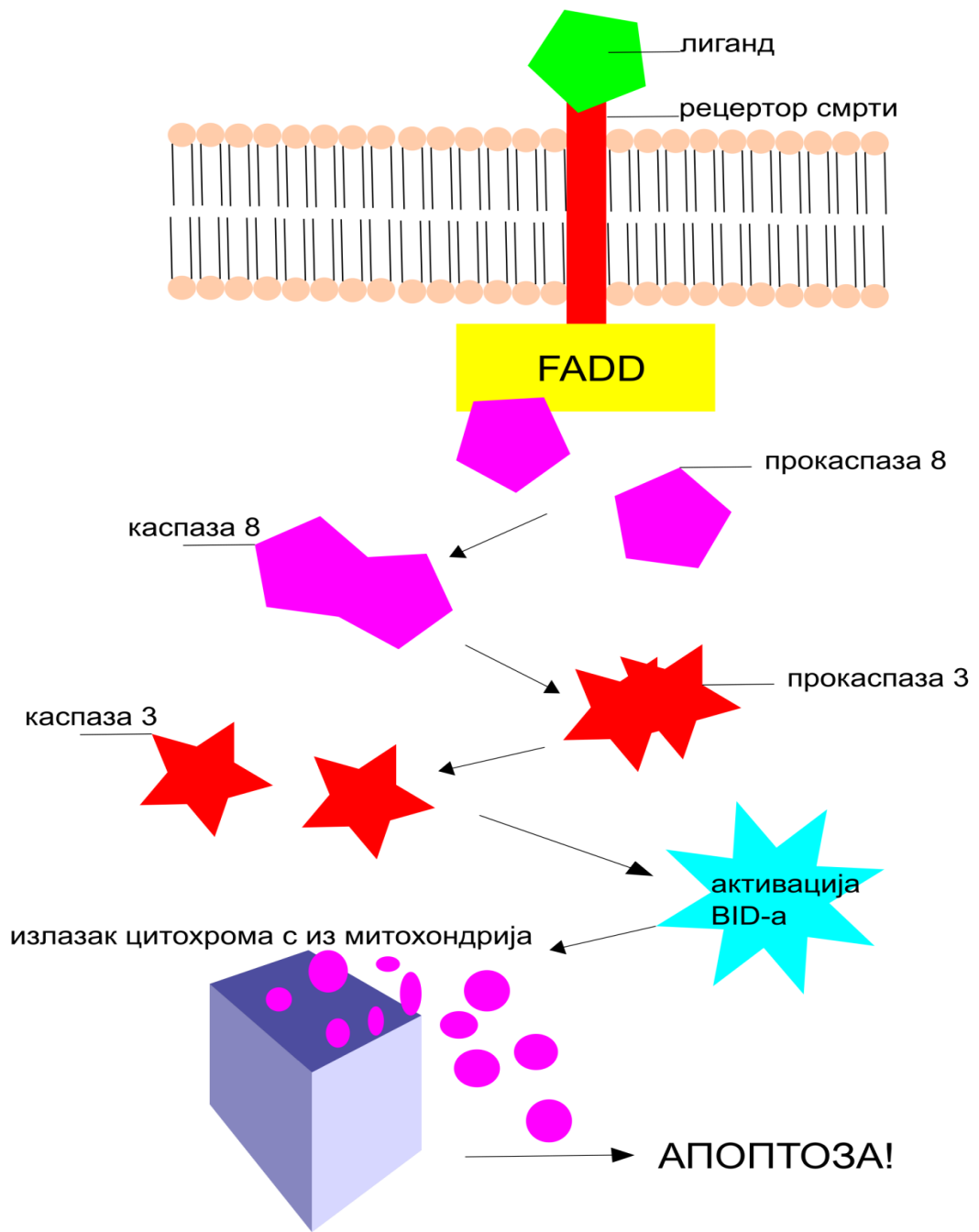
До сада су јасно и детаљно објашњена два сигнална пута, која могу недвосмислено покренути сам процес апоптозе. У циљу иреверзибилног активирања процеса апоптозе, кључно је покренути један од два есенцијална пута, пут рецептора смрти (спољашњи пут) или унутрашњег апоптотски пут (80-82). Уколико активирамо било спољашњи или унутрашњи сигнални пут апоптозе, доћи ће до промена у концентрацији есенцијалних кључних молекула апоптозе као што су *Bcl-2* протеини (антиапоптотски) и *Bax* протеин (проапоптотски), што за последицу има формирање апоптотских телашаца и на крају фагоцитозу од стране макрофага. Оно што је заједничко за претходно наведена два сигнална пута јесте њихова повезаност преко митохондрија (81, 82).

1.4.2 СПОЉАШЊИ ПУТ АПОПТОЗЕ

Да би се активирао спољашњи пут апоптозе неопходна је активација спољашњих трансмембранских ћелијских рецептора који спадају у суперфамилију протеина рецептора смрти (80, 83).

У ову групу молекула смрти спадају *TRAIL-R1/2*, *Fas (CD95)*, као и рецептор 1 фактора некрозе тумора (енг. *TNF-R1, tumor necrosis factor receptor 1*). Наведени чланови који спадају у суперфамилију протеина рецептора смрти, у својој структури садрже цитоплазматски домен који називамо домен смрти (енг. *DED, death effector domains*) (83, 84).

Уколико дође до везивања одговарајућег лиганда за рецептор смрти, активираће се и цитоплазматски *DED* и доћи ће до везивања интраћелијских адапторних протеина *FADD* (енг. *FADD, Fas associated death domain*). Даље, неактивна прокаспаза 8 се везује за *FADD* и долази до њене активације у каспазу 8 (слика 1). Затим, активна каспаза 8 врши цепање ефекторске прокаспазе 3 у каспазу 3 и следи програмирана ћелијска смрт, апоптоза (84).



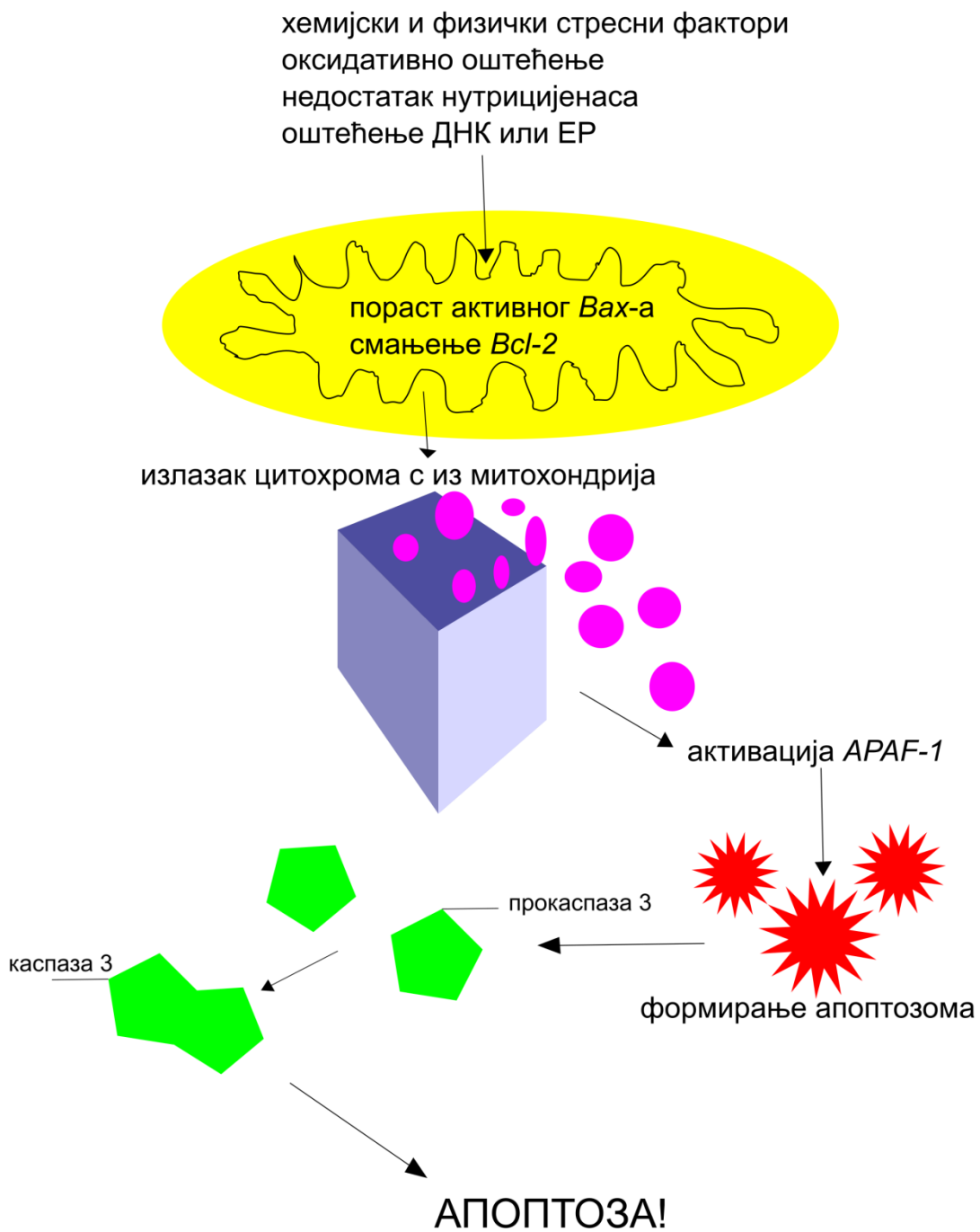
Слика 1. Активација спољашњег пута апоптозе

1.4.3. УНУТРАШЊИ ПУТ АПОПТОЗЕ

Други, унутрашњи пут апоптозе обухвата реакцију ћелија на велики број штетних фактора, укључујући оштећење молекула ДНК, губитак фактора раста, оштећења реактивним кисеоничним врстама и топлотна оштећења (80, 85). За све наведене штетне факторе је заједничко да доводе до оштећења митохондрија. Митохондрије губе трансмембрански потенцијал, долази до губитка електронског транспорта и последично смањене продукције АТП-а. Даље, долази до повећане пермеабилности митохондријалне мембране и последичне транслокације цитохрома *c* у цитоплазму. Цитохром *c* формира комплекс са *APAF-1* (енг. *APAF-1, apoptosis-activating factor*) и последично долази до активирања каспазе-3 (слика 2), формирања апоптозома, и на крају индукције програмиране ћелијске смрти, апоптозе (80, 82, 85).

Као што је наведено у претходном тексту, процес апоптозе је строго контролисан, а есенцијални кључни молекули митохондријалног пута програмиране ћелијске смрти су протеини *Bcl-2* суперфамилије. Регулаторни протеини *Bcl-2* фамилије контролишу пермеабилност митохондријалне мембране, односно регулишу сам излазак молекула из митохондрија у цитосол. Фамилија *Bcl-2* протеина је подељена на основу улоге у процесу апоптозе у две велике групе, антиапоптотични (*Bcl-2* и *Bcl-xL*) и проапоптотични протеини (*Bax*, *Bak*) (80, 86).

Када дође до активације унутрашњег митохондријалног пута апоптозе, активира се *Bax* протеин односно ослобађа се аминокрај *Bax* протеина од регулаторног молекула *Bcl-2*. Прецизније, долази до померања *Bax* протеина изван цитоплазме у мембрану митохондрија (спољашња мембрана) као и формирања активног *Bax*-а. Оваква олигомерна, активна форма проапоптотичног протеина доводи до формирања шупљина (пора) у мембрани митохондрија, а све то за последицу има повећану пермеабилност митохондријалне мембране. Услед повећане пермеабилности митохондријалне мембране долази до изласка цитохрома *c* изван митохондрија, нова локализација је цитосол. Када се нађе у цитосолу, цитохром *c* се везује за протеин *Apa1-1*, што за последицу има трансформацију неактивне прокаспазе-9 у каспазу-9. У следећем кораку, активна каспаза 9 има кључну улогу у модификацији неактивне прокаспазу-3, формира се егзекуторска каспаза-3, која извршава сам процес апоптозе (80, 82, 87).



Слика 2. Активација унутрашњег пута апоптозе

1.4.4. КАСПАЗЕ

Каспазе (група цистеин зависних специфичних протеаза) имају есенцијалну улогу у процесу апоптозе, представљају ендопептидазе које хидролитичким путем уз помоћ молекула воде раскидају пептидне везе (88).

На основу својих улога каспазе су подељене у две велике групе: протеини који имају кључну улогу у активацији програмиране ћелијске смрти и протеини који учествују у инфламацији. Стога, јасно можемо закључити да осим апоптозе, каспазе учествују и у процесу инфламације (88-90).

Када се говори о синтези каспаза, битна је чињеница да се каспазе у ћелији синтетишу као прокаспазе, односно неактивни мономери. У циљу формирања каспаза, неопходна је димеризација протеина. Такође неопходна је и протеолиза (88).

Иницијаторске каспазе, каспаза-8 и каспаза-9, учествују у формирању ефекторских молекула који извршавају процес програмиране ћелијске смрти (91). Ефекторске, односно егзекуторске каспазе (каспаза-3, каспаза-6, каспаза-7) се синтетишу у облику прокаспаза (88, 92). Од кључног је значаја да иницијаторске каспазе раставе егзекуторне протеине на субјединице (малу и велику), а све у циљу активирања ефекторских каспаза (88). Услед овакве конформационе промене ефекторских каспаза, омогућена је и њихова функција у самом процесу програмиране ћелијске смрти.

1.5. ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС

Сам механизам ћелијске деобе, углавном је исти код свих ћелија које се активно деле. Од есенцијалног значаја је да процес деобе ћелије, обезбеди самој ћелији да прецизно удвостручи своје саставне делове односно једна ћелија се дели на две нове ћелије (76).

Како ћелијски циклус представља врло комплексан и прецизно регулисан процес, ради лакшег и темељног разумевања поделили смо га неколико циклуса: *G1* (енг. *Gap phase 1*), *S* (енг. *Synthesis*), *G2* (енг. *Gap phase 2*) и *M* (енг. *Mitosis*). *G1*, *S* и *G2* фаза чине интерфазу, која суштински представља период између две деобе ћелије. Када се ћелијска деоба успешно заврши, већина ћелија улази у фазу мировања која се означава као *G0*, из које могу изаћи под утицајем специфичних митогена, тј. фактора раста. Поједине ћелије у овом стању мировања могу остајати дужи временски период или трајно у зависности од метаболичких и функционалних потреба саме ћелије. Један пример за то су неутрофили, који трајно остају у *G0* фази (93, 94).

Есенцијалну улогу у строгој контроли ћелијског циклуса представљају тачке у којима је регулисан ћелијски циклус (енг. "*checkpoints*"), захваљујући изузетно контролисаном процесу функционисања различитих протеина. Те протеине пре свега чине циклини, циклин зависне киназе (енг. *cyclin dependent kinases, Cdks*) и инхибитори циклин зависних киназа (енг. *cyclin dependent kinase inhibitors, CDIs*). Како се мењају претходно наведене фазе ћелијског циклуса, тако се и синтетишу циклини који су по својој структури протеини. Ензими, циклин зависне киназе, по својој структури спадају у групу серин-треонин киназа, чија је фундаментална улога у прецизној регулацији ћелијског циклуса. Откривено је преко 20 различитих типова *Cdks*, при чему се значајност недвосмислено огледа у процесу фосфорилације молекула чиме се регулишу кључне фазе у ћелијском циклусу. Управо ензимско функционисање циклин зависних киназа регулисано је молекулима *CDIs*. Сама улога у супресији *Cdks* је у активном заустављању прогресије ћелије из тренутно активне фазе у следећу фазу прогресије циклуса, под условом да нису повољни услови средине по ћелију. Молекули, протеини *CDIs* се деле на две велике групе на основу њихове структуре: *Ink4* фамилија којој припадају *p16^{INK4a}* (*Cdkn2a*), *p15^{INK4b}* (*Cdkn2b*), *p18^{INK4c}* (*Cdkn2c*) и *p19^{INK4d}* (*Cdkn2d*), и *CIP/Kip* фамилије где спадају *p21^{Cip1}* (*Cdkn1a*), *p27^{Kip1}* (*Cdkn1b*) и *p57^{Kip2}* (*Cdkn1c*) (93, 94).

1.5.1. *G1/S* ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Када говоримо о ћелијском циклусу, неходно је напоменути да *G1* фаза представља период интензивног раста ћелије и карактеристично је да временски траје најдуже. Услед самог повећања ћелије у *G1* фази, долази и до веома интензивне, појачане синтезе протеина који имају градивну улогу и ензимску улогу. Након што започне процес ћелијске деобе, такође долази и до активне продукције циклина *D*, а са напредовањем ове фазе, повећава се концентрација претходно поменутог протеина. Постоје три врсте циклина *D* (*D1*, *D2*, *D3*). Ови циклини се везују *Cdk4/Cdk6* чија је есенцијална улога у фосфорилацији протеина ретинобластома (*pRb*). У својој хипофосфорилисаној форми *pRb* је у стабилном комплексу са транскрипционим фактором *E2F-1* и на тај начин га инхибира. (93-96).

Стога процесом фосфорилације *pRb*-а долази до структурне промене у овом молекулу што за последицу има ослобађање *E2F-1* транскрипционг фактора. Транскрипциони фактор *E2F-1* делује на циљне гене, односно активира циклин *A* и *E* као и бројне протеине који су есенцијални за процес репликације ДНК. Такође, додатну фосфорилацију *pRb*-а индукује циклин *E* у комплексу са *Cdk2* и управо ово представља контролну тачку од које зависи прогресија циклуса (93).

Даље у *S* фази одиграва се процес репликације ДНК при чему долази до дуплирања генетског материјала, диплоидна $2n$ се конвертује у тетраплоидну $4n$ ћелију. Оштећење молекула ДНК у *G1* фази ћелијског циклуса, могу узроковати различити физички или хемијски агенси, као и оксидативни стрес. Приликом оштећења ДНК молекула, јасно ће се повећати транскрипциона активност протеина *p53*. Услед активације овог тумор-супресорског протеина *p53* интензивира се синтеза протеина инхибитора ћелијског циклуса *p21*. Комплекси циклина и циклин зависних киназа који су се формирали у *G1* фази су инхибирани од стране синтетисаног и активiranог *p21* протеина који има једну од фундаменталних улога у инхибирању прогресије ћелијског циклуса. Стога као последица оваквог типа инхибиције доћи ће до привременог застоја ћелијског циклуса што ће омогућити, ензимима поправке ДНК молекула да отклоне настала оштећења у молекулу ДНК. Уколико је ово оштећење иреверзибилно јасно је да неће доћи до репарације и поправке овог молекула, већ ће се накнадно индуковати процес програмиране ћелијске смрти, односно апоптоза (93, 97).

1.5.2. G2/M ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Процесу митозе претходи *G2* фаза ћелијског циклуса. Карактеристично за ову фазу циклуса је дуплирање броја хромозома и осталих делова ћелије, а циљ је настатанак две ћерке ћелије. Током активне *G2* фазе ћелијског циклуса успоставља се стабилна веза између циклина *A* и *Cdk2*, а затим циклина *A* и *Cdk1* и на крају циклина *B* и *Cdk1*, што је есенцијално за прогресију ћелијског циклуса из *G2* у *M* фазу. Овако активирани комплекси циклина и циклин зависних киназа, омогућавају укључивање бројних молекула који су задужени за деполимеризацију ћелијске мембране, стварање митотског вретена и митозу. Раздвајање хроматида и финалну поделу ћелије узрокује комплекс *APC* (енг. *Anaphase-promoting complex*), чиме се процес митозе завршава (93, 98).

Дефект на нивоу хромозома, може јасно довести до застоја у *G2* фази. Приликом оштећења хромозома, услед застоја у *G2* фази, активира се транскрипција протеина *p21* на *p53* зависан начин, што у крајњој инстанци доводи до застоја у ћелијској прогресији (93, 95).

Након структурних промена у ДНК молекулу, ћелијски циклус је заустављен у свим фазама циклуса. Уколико је оштећење мање, постоје контролни механизми који могу реверзибилно оштећење поправити и ћелија може да настави деобу. У случају када имамо већа и иреверзибилна оштећења, ћелија ће индуковати процес апоптозе и тиме ће се спречити деоба (93).

Од есенцијалног је значаја разумевање ћелијског циклуса, као и молекула који учествују у циклусу. Потенцијалну мету за ефективну антитуморску терапију, могу представљати управо механизми и молекули који контролишу ћелијски циклус.

1.6. ЛЕКОВИ КОЈИ СЕ КОРИСТЕ У ХЕМИОТЕРАПИЈИ МАЛИГНИТЕТА

Хемиотерапеутике који се користе у терапији различитих типова малигнитета смо поделили у неколико категорија:

1. Цитотоксични лекови
 - а) Алкилирајући агенси и сличне супстанце, њихов механизам деловања је усмерен ка стварању ковалентних веза са молекулом ДНК, чиме се спречава процес репликације и деоба малигне ћелије
 - б) Антиметаболити, механизам ове групе лекова се огледа у опструкцији ћелијских путева који су есенцијални у процесу синтезе ДНК туморских ћелија
 - в) Цитотоксични антибиотици, ова група лекова води порекло из микроорганизама и спречавају деобу малигно измењених ћелија
 - г) Деривати биљака (винка алкалоиди, таксани, кампотецини), везују се за микротубуле и спречавају формирање деобног вретена
2. Хормони (естрогени, андрогени, гликокортикоиди) и лекови који супримирају секрецију хормона
3. Остали агенси, у ову групу лекова улазе супстанце које не спадају у претходно наведене групе (99).

Алкилирајући агенси у својој структури садрже хемијске групе које могу формирати ковалентне, хемијски чврсте везе са азотним базама које улазе у састав молекула ДНК. Атом азота који је у позицији 7 гванина је у хемијском смислу нуклеофилан, стога може бити циљни молекул за алкилирајуће агенсе. Везивањем за молекул ДНК малигне ћелије, ремети се процес транскрипције као и процес трансляције (100). Кључни ефекти ових агенаса су оштећење молекула ДНК и индукција процеса апоптозе. Могу деловати у свим фазама ћелијског циклуса, мада највећи антитуморски ефекат се манифестује блокадом током *S* фазе ћелијског циклуса, са застојем у *G2* фази (99). У ову групу антиканцерских лекова се убрајају цисплатина, карбоплатина, прокарбазин, дакарбазин (99, 100).

Антиметаболити блокирају метаболичке путеве који су есенцијални за синтезу ДНК молекула малигне ћелије. Прецизније, њихов механизам деловања може бити заснован на конкуренцији са молекулима који у физиолошким условима учествују у синтези молекула ДНК. Најпознатији и основни лек који спада у антиметаболите је метотрексат. У групу антиметаболита још спадају и пурински аналози (меркаптопурин, флударабин), хидроксиуреа, цитарабин, 5-флуороурацил (99-101).

У терапији малигнитета се користе и поједини антибиотици, а они свој антитуморски ефекат испољавају спречавањем деобе малигно измењених ћелија. У ову групу лекова спадају антрациклини (доксорубицин и даунорубицин) и блеомицин. Механизам спречавања деобе малигно измењених ћелија се заснива на интеркалирању између две повезане азотне базе у ДНК молекулу. Такође важно је нагласити да ова група антиканцерских лекова може инхибирати ДНК топоизомеразу I и II (99, 100).

Малигнитети настали из хормон-сензитивних ткива, представљају хормон-зависне туморе. Туморски раст хормон-зависних тумора може бити инхибиран хормонима који имају супротно деловање, антагонистима или лековима који инхибирају синтезу одговарајућег хормона (100). Хормонска терапија има највећи ефекат у терапији карцинома дојке и простате (100, 102, 103). У лечењу карцинома простате неопходан је терапијски приступ који подразумева супресију лучења мушких полних хормона (70, 103). Из тог разлога у терапији овог карцинома се користе антагонисти андрогена, флутамид и ципротерон (70, 100, 103).

1.7. КОМПЛЕКСИ МЕТАЛА У МЕДИЦИНИ

Биоактивни комплекси метала представљају будућност антитуморске као и антимикробне терапије (104, 105). Сви метали, односно њихови одговарајући комплекси показују мањи или већи степен биолошке активности (104). Прецизније, свој антитуморски механизам показују на различите начине. Велики број синтетисаних поетнцијалних хемиотерапеутика који имају у структури имају прелазне метале се могу закачити за молекуле ДНК малигне ћелије и онемогућити процес репликације канцерских ћелија (105). Даље, могу проузроковати хиперпродукцију реактивних кисеоничних радикала, променити мировни мембрански потенцијал митохондрија малигне ћелије, активирати спољашњи или унутрашњи пут апоптозе (106).

Можемо закључити дакле, да комплекси метала имају велики терапијски потенцијал, а разлог је њихова фундаментална карактеристика, редокс активност, као и могућност везивања за важне биомолекуле који имају есенцијалну улогу у ћелијском преживљавању (104-107).

Најзначајнији представници комплекса метала који се веома успешно користе у терапији против различитих типова малигнитета су цисплатина, карбоплатина и оксалплатина (108). Наведени лекови садрже у својој структури платину као металну компоненту и одобрила их је су од Америчка Администрација за храну и лекове (енг. *FDA, Food and Drug Administration*) (108, 109).

При испитивању металних комплекса који не садрже у својој структури платину, комплекси рутенијума, злата, бакра, паладијума су показали снажан цитотоксични ефекат на различите туморске ћелијске линије *in vitro* (105, 110, 111) . Веома је битно нагласити да комплекси који садрже рутенијум као метал, *NAMI-A* и *KP1019* су дошли до фазе развоја где се испитују у клиничким студијама (112).

1.7.1. ЦИСПЛАТИНА

Цисплатина је лек који се годинама успешно апликује у терапији најразличитијих врста малигнух промена (105, 113). Овај хемиотерапеутик је заправо хидросолубилни комплекс који садржи метал, платину, који је окружен са две амонијум групе као и два атома хлора (99, 113). У терапији малигнитета примењује се интравенском инјекцијом или инфузијом (99, 100). Како би цисплатина стигла до циљне, малигну измењене ћелије, неопходно је да се у плазми веже за протеине плазме, албумин и трансферин. Након доласка цисплатине до циљне, малигне ћелије, сам улазак је могућ захваљујући пасивној дифузији или транспортним протеинима чија је локализација на ћелијској мембрани (99). Када цисплатина уђе у туморску ћелију, атом хлора дисоцира из комплекса, чиме је омогућено да се новонастали комплекс веже за молекулу ДНК (99, 113). Дејство цисплатине је веома слично ефекту алкилирајућих агенаса. Прецизније, долази до везивања цисплатине за азот у положају 7, што за последицу има денатурацију ДНК молекула (113). Даље, денатурација ДНК молекула има за последицу индукцију процеса апоптозе малигне ћелије (99, 100).

Веома често, канцерске ћелије након одређеног терапијског времена цисплатином показују висок степен резистенције (105, 113). Најзначајнији механизам који омогућава резистенцију на терапију је смањено преузимање цисплатине од стране туморских ћелија. Смањењем концентрације hTCR1 (протеин за транспорт бакра, енгл. *copper transporter pump*) који има кључну улогу и у транспорту цисплатине, долази до последично смањеног преузимања овог комплекса од стране туморских ћелија (114). Истраживања су недвосмислено показала да цисплатина смањује концентрацију никотин амид аденин динуклеотида, односно долази до смањеног односа $NAD^+/NADH$ на рачун NAD^+ (114, 115). Проблем је што туморске ћелије за разлику од малигну неизмењених ћелија имају могућност да упркос смањењу концентрације NAD^+ могу преживети и последично избећи процес апоптозе (115). Глутатион је трипептид чија је редукована форма неопходна да штити ћелију од негативног ефекта реактивних кисеоничних врста, а због своје високо реактивне тиол групе може инактивирати цисплатину и тиме спречити да се индукује процес апоптозе у малигну ћелији (115, 116).

Као што је напоменуто цисплатина има веома широку терапијску примену, али такође у терапијској примени има и ограничења која воде порекло од великог броја нежељених ефеката (105, 117). Цисплатина може озбиљно да оштети бубрежну функцију, односно јавља се нефротоксичност која може водити и ка развоју акутне бубрежне инсуфицијенције (117). Поред тога нежељена дејства даље обухватају и неуротоксичност, поремећај вида, слуха, мучнину и повраћање (117-119).

Из претходно наведених разлога неопходно је активно трагање за новим хемиотерапеутицима који у својој структури имају метал и који ће показати већу селективност према туморским ћелијама, снажан цитотоксични ефекат према цисплатин резистентним туморима. У такве комплексе, управо спадају и комплекси паладијума.

1.7.2. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА

Паладијум је откривен 1803. године од стране хемичара пореклом из Велике Британије, Вилиама Х. Воластона, који је такође и детаљно објаснио особине овог тада новооткривеног метала (120). Атомски број паладијума је 46, и представља метал VIIIВ групе. Примена паладијума је веома широка, користи се у електроници, зубној медицини и у изради накита. Најстабилнија, као и уобичајна оксидациона стања паладијума су +2 и +4 (121).

Кључну прекретницу у проучавању биолошких активности различитих метала, представљало је откриће дисплатине, као и веома успешна клиничка примена овог лека. Стога, јасно је да је посебна пажња усмерена на биолошку активност комплекса који у својој структури садже паладијум. Актуелна истраживања у којима се испитује цитотоксичност комплекса који у својој структури садрже паладијум, су недвосмислено показала да комплекси поседују снажан цитотоксични ефекат на различите туморске ћелијске линије *in vitro* (122).

Научна студија публикована од стране *Tekin* и сарадника је јасно показала да *Pd(II)* комплекси испољавају снажан цитотоксични ефекат на две леукемијске ћелијске линије хуманог порекла *HL-60* и *K562*. Цитотоксични ефекат ових *Pd(II)* комплекса је постигнут индукцијом процеса програмиране ћелијске смрти, апоптозе (123). Даље, научна студија спроведена од стране *Јоксимовића* и сарадника доказала је снажан цитотоксични ефекат *Pd(II)* комплекса на туморске ћелије карцинома дојке *MDA-MB-231* и карцинома грлића материце *HeLa in vitro*. Значајан пад стопе преживљавања туморских ћелија је постигнуто индукцијом програмиране ћелијске смрти или заустављањем убрзаног дељења малигнућих ћелија (124). Веома је битна чињеница да су синтетисани *Pd(II)* комплекси у научним студијама *Otondi* и сарадника као и *Јоксимовића* и сарадника показали висок степен селективности према туморским ћелијским линијама, са веома slabим цитотоксичним ефектом према малигну неизмењеним фибробластима (106, 125). *Espino* и сарадници су у свом истраживању такође демонстрирали да *Pd(II)* комплекси значајно смањују стопу преживљавања туморских ћелија индукцијом процеса апоптозе (126).

Када говоримо о карциному простате, *Ulukaya* и сарадници су доказали да *Pd(II)* комплекси сигнификантно (статистички значајно) смањују стопу преживљавања ћелијских линија карцинома простате *in vitro* (127). Такође, *Plutin* и сарадници су показали да синтетисани *Pd(II)* комплекси показују снажан ефекат на ћелијској линији карцинома простате *in vitro* (128). *Al-Jibori* и сарадници су показали антипролиферативни ефекат *Pd(II)* комплекса на три ћелијске линије карцинома простате (129).

Из претходно наведених научних публикација можемо јасно закључити да *Pd(II)* комплекси показују снажан цитотоксични ефекат према различитим типовима карцинома, индукују процес апоптозе туморских ћелија, а такође показују и селективност. Такође, оно што је од есенцијалног значаја за нашу студију је снажан антипролиферативни ефекат *Pd(II)* комплекса и према туморским ћелијама карцинома простате.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ

Циљеви наше студије су:

1. Тестирање потенцијалног антитуморског ефекта новосинтетисаних *Pd(II)* комплекса са следећим лигандима:
 - 1) 2-амино-4-(3,4 дифлуорофенил) тиазол (комплекс *C1*)
 - 2) 2-амино-4-(2,4 дифлуорофенил) тиазол (комплекс *C2*)
 - 3) 2-амино-5-метил-4-фенилтиазол (комплекс *C3*)
 - 4) 2-амино-4-фенилтиазол (комплекс *C4*)
 - 5) 2-амино-4-(4-хлорфенил) тиазол (комплекс *C5*)на ћелијске линије:
 - 1) *DU-145* - ћелијска линија карцинома простате
 - 2) *PC-3* - ћелијска линија карцинома простате
 - 3) *MRC-5* - ћелијска линија малигно неизмењених фибробласта
2. Испитивање односа ћелија карцинома простате које се налазе у некрози и апоптози, услед тестирања *Pd(II)* комплекса.
3. Испитивање ефекта *Pd(II)* комплекса на однос протеина *Bax* (проапоптотични) и *Bcl-2* протеина (антиапоптотичног).
4. Испитивање утицаја *Pd(II)* комплекса на активацију протеина *Bax* и каспазе-3
5. Дефинисање вероватноће да тестирања *Pd(II)* комплекси прекидају прогресију ћелијског циклуса карцинома простате у некој фази.

Радне хипотезе истраживања су следеће:

1. Комплекси паладијума *C1-C5* показују снажан цитотоксични ефекат на малигне ћелије карцинома простате а знатно слабији цитотоксични ефекат показују на малигно неизмењене фибробласте.
2. Истраживани комплекси паладијума индукују процес апоптозе канцерских ћелија, при томе долази до повећања релативног однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до формирања активног *Bax*-а као и активације протеина каспаза-3.
3. Тестирања једињења паладијума стопају пролиферацију канцерских ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

КОРИШЋЕНИ ХУМАНИ МАТЕРИЈАЛ И ТИП ИСТРАЖИВАЊА

Наше истраживање је било замишљено и спроведено у виду експерименталне студије *in vitro*. У студији су биле коришћене искључиво хумане ћелије које су комерцијално доступне истраживачима из целог света у облику ћелијских линија. Тестиране ћелијске линије су следеће:

- PC-3
- DU-145 и
- MRC-5

Ћелије PC-3 (CRL-1435™, <https://www.atcc.org/products/crl-1435>) су епителне ћелије изоловане из метастазе у костима 62-годишњег мушког пацијента са аденокарциномом простате градуса IV.

Ћелије DU-145 (HTB-81™, <https://www.atcc.org/products/htb-81>) су ћелије епителијалне морфологије изоловане из метастазе у мозгу 69-годишњег мушког пацијента са карциномом простате.

Ћелије MRC-5 (CCL-171™, <https://www.atcc.org/products/ccl-171>) су ћелије хуманих фибробласта способне за 42 до 46 удвостручавања своје популације.

Ћелије PC-3 смо добили љубазношћу проф. др Срећка Трифуновића са Природно-Математичког Факултета.

Ћелије DU-145 су купљене од захваљујући средствима домаћег истраживачког пројекта Факултета медицинских наука број: ЈП 12/19.

Ћелије MRC-5 су добијене захваљујући љубазности колега са Медицинског факултета Универзитета у Београду, превасходно проф. др Соњи Мисирлић Денчић.

Сва три типа хуманих ћелија су одржаване и култивисане на сличан начин. Замрзнута суспензија ћелија је из криовајлица запремине 2 mL, интензивним мешањем у топлој води одмрзавана у топлој води у трајању не дужем од два минута. Након тога је течан садржај криовајлица извучен и пребачен у стерилне епрувете које су садржале 13 mL комплетног медијума. После центрифугирања 10 минута на 1000 обртаја/мин. супернатант је извучен из епрувета, талог ћелија је одвојен краткотрајним вортексовањем и у епрувету је додато 3 mL комплетног медијума. Потом је целокупан садржај епрувете пребачен у пластичне, вентилирајуће, стерилне флашкове за ћелијске културе запремине 25 cm³. Флашкови су одмах пребачени у инкубатор за ћелијске културе у коме је присутна апсолутна влажност и 5% CO₂. Температура у којој су ћелије култивисане била је увек константна и износила је 37°C.

Све тестиране ћелијске линије су одржаване у комплетном медијуму за ћелијске културе који смо припремали у складу са инструкцијама произвођача (ATCC, American Type Culture Collection) и то на следећи начин:

- 10% запремине је чинио топлотом инактивисани говећи серум (FBS, fetal bovine serum, Sigma, Catalog Number: F7524, https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/product/sigma/f7524?gclid=CjwKCAjwiuuRBhBvEiwAFXKaNF0dAvt2CAYCISfK23VILHOseq24AjWBGHvsTe3WpuADuB2LIPZ0kBoCSHYQAvD_BwE)

- 1% - додаване су неесенцијалне аминокиселине (*NEAA - Non-Essential Amino Acid Cell Culture Supplement, Gibcotm Catalog number. 11140050, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11140050>*)
- 89% запремине је чинио основни медијум за ћелијске културе и то DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) са високом концентрацијом глукозе и L-глутамином (*Capricorn Scientific, Catalog number: p1126, <https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/dmem-high-glucose-4-5-g-l-with-l-glutamine~p1126>*)

Све ћелије су култивисане до конfluентности флашка од 90% када је вршено њихово расејавање. Сви експерименти су извођени у фази експоненцијалног раста ћелија са три узастопна понављања из различитих пасажа ћелијских култура, како би се добили валидни резултати. Све остали реагенси које смо користили у овим истраживањима су добијени од стране Сигме (*Sigma, Germany*), осим уколико није другачије назначено.

Комплетна манипулација ћелијама је вршена у стерилним условима у ламинарној комори са вертикалним протоком ваздуха. Сав материјал је прскан медицинским алкохолом (70% етанол) пре враћања у инкубатор и пре убацивања у ламинарну комору.

3.1. ТЕСТИРАНА ЈЕДИЊЕЊА

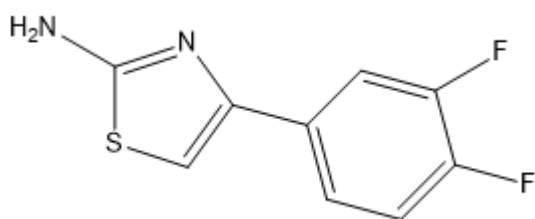
Комплекси паладијума(II) су синтетисани на Природно-математичком факултету од стране истраживачке групе под руководством проф. др Срећка Трифуновића. Пет таквих комплекса опште формуле $[(PdL_2)]Cl_2$ са 2-аминотиазолима (*L1-L5*), где је:

- *L1* = 2-амино-4-(3,4-дифлуорофенил)тиазол,
- *L2* = 2-амино-5-метил-4-фенилтиазол,
- *L3* = 2-амино-4-фенилтиазол,
- *L4* = 2-амино-4-(4-хлорофенил)тиазол и
- *L5* = 2-амино-4-(2,4-дифлуорофенил)тиазол (слика 3).

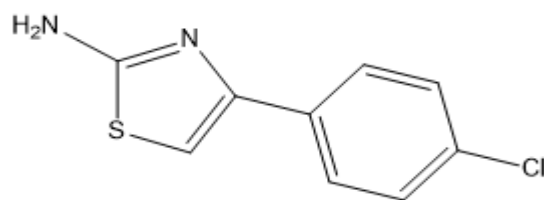
Свих пет комплекса паладијума(II) су синтетисани и окарактерисани елементарном микроанализом и инфрацрвеном и *NMR* спектралном анализом.

Комплексе паладијума(II) смо означили са *C1-C5* (слика 4).

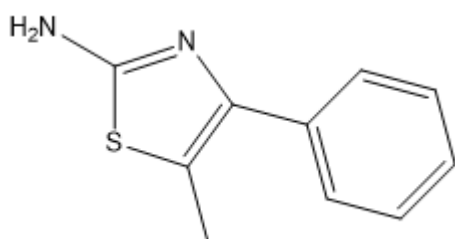
L1 = 2-amino-4-(3,4 – difluorofenil)tiazol



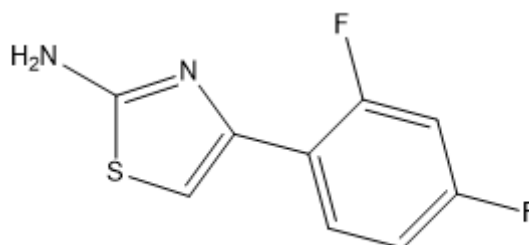
L4 = 2-amino-4-(4-hlorofenil)tiazol



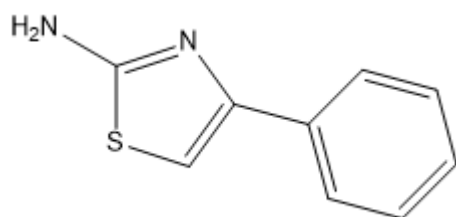
L2 = 2-amino-5-metil-4-feniltiazol



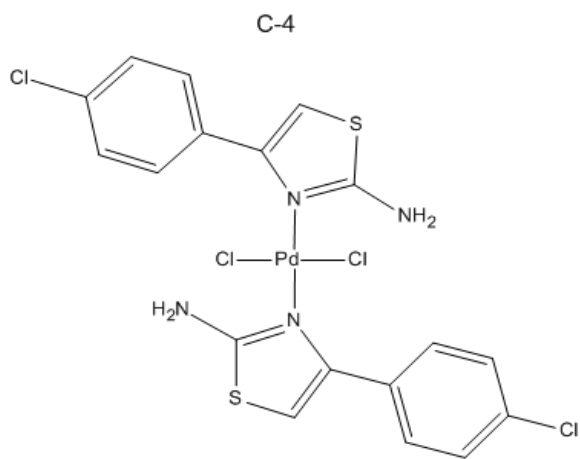
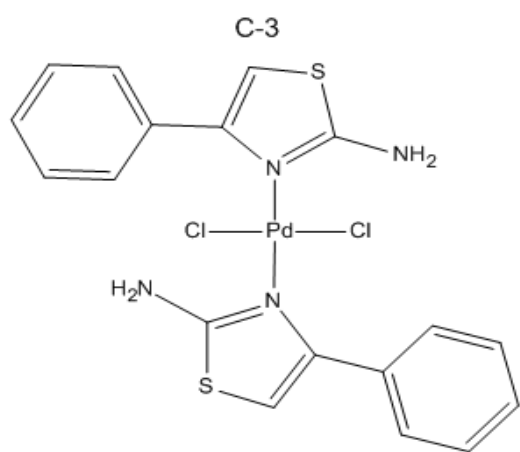
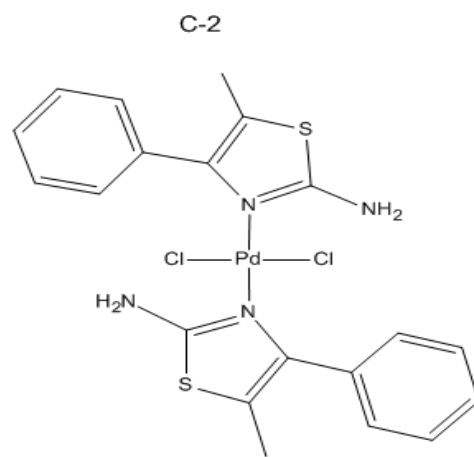
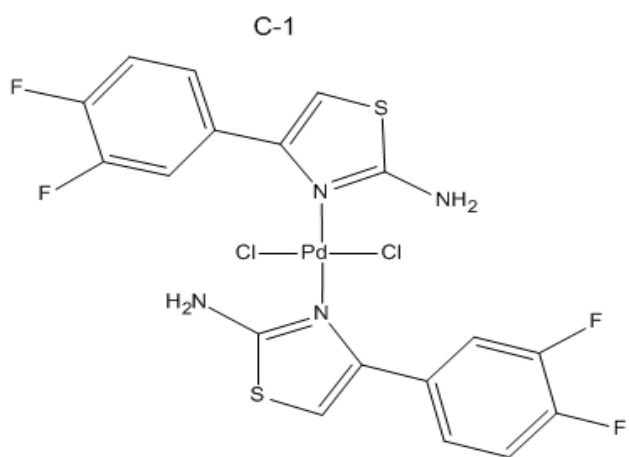
L5 = 2-amino-4-(2,4 – difluorofenil)tiazol

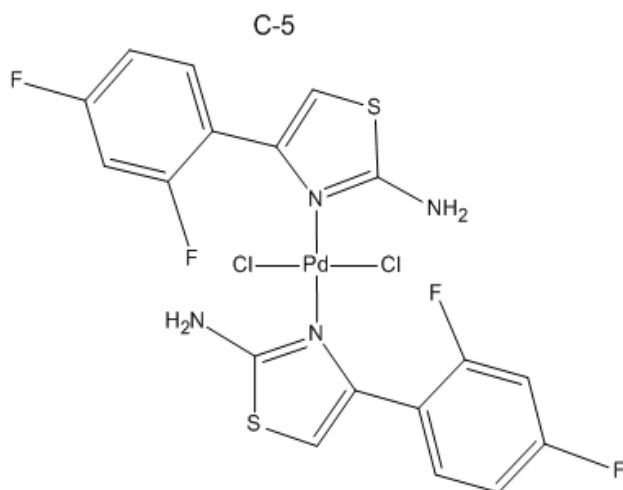


L3 = 2-amino-4-feniltiazol



Слика 3. Структура лиганда (L1-L5)





Слика 4. Структуре паладијум комплекса (C1-C5)

Након што је потврђена њихова структура, свих пет комплекса и лиганда је добијено у количини од по 10 mg и са том количином је извршено њихово антитуморско тестирање на претходно споменутих ћелијским културама малигних тумора простате, као и на здравим ћелијама, односно на хуманим фибробластима *in vitro*. Показало се да се сви комплекси јако добро растварају у диметилсулфоксиду (*DMSO, dimethylsulfoxide*), а да нису растворљиви у води. Из тог разлога смо све комплексе и лиганде растварали у диметилсулфоксиду, а разблаживали у медијуму за ћелијске културе, тако да концентрација диметилсулфоксида у раствору никада није прелазила концентрацију која је токсична за ћелије и која износи 0,05% *v/v*. Сва једињења су растварана непосредно пре извођења експеримената чиме смо осигурали да диметилсулфоксид не утиче на структуру самих комплекса. Претходно је стабилност комплекса после три временска интервала након растварања у диметилсулфоксиду потврђена посматрањем и снимањем *UV-Vis* спектра, што је забележено *Perkin-Elmer Lambda 35* спектрометром.

3.2. ВАРИЈАБЛЕ ИСТРАЖИВАЊА

Независне варијабле (узрок) нашег истраживања су чинили примењени комплекси паладијума(II) и њихови лиганди, а резултати стопе преживљавања (вијабилности), цитотоксичности, апоптозе и ћелијског циклуса тестираних ћелија су биле зависне варијабле (исход) наше студије.

3.3 МТТ ТЕСТ

Стопа преживљавања (вијабилност) ћелија након третмана комплексима паладијума(II), односно цитотоксичност новосинтетисаних паладијум(II) комплекса и одговарајућих лиганада испитивана је МТТ-тестом.

МТТ тест је тест стопе преживљавања, тј. метаболичке активности ћелија. Њиме се детектује активност ћелијске *NAD(P)H*-зависне оксидоредуктазе која је присутна у живим ћелијама. Основна премиса теста је да што је ова оксидоредуктаза активнија, односно што је њена активност већа у средини где су ћелије присутне, то значи да има више живих ћелија. Наравно, уколико је активност овог ензима мања у једној групи ћелија у односу на другу групу са приближно истим бројем ћелија, то значи да је из неког разлога дошло до смањења броја живих ћелија у првој групи посматраних ћелија. Стога је за правилну анализу резултата овог теста неопходна контролна популација ћелија које нису изложене нити једном агенсу, већ су култивисане у чистом, комплетном медијуму. Сама *NAD(P)H*-зависна оксидоредуктаза је одговорна за редукцију жутог раствора тетразолијум-бромида *5mg/ml PBS*-а у формазан, који је љубичасте боје. Укратко, што је раствор који садржи одређени број ћелија више љубичаст након извођења МТТ теста, то је био присутан већи број живих ћелија у том раствору, односно ћелије су више вијабилне, односно, нека супстанца је показала мањи цитотоксични ефекат.

Стопа преживљавања сва три типа тестираних ћелија (два различита типа ћелија тумора простате *PC-3* и *DU-145*, као и *MRC-5* фибробласта) је испитана 24, 48 и 72 сата у присуству растућих вредности моларних концентрација (моларности) до 100 μ M новосинтетисаних комплекса *C1-C5* и лиганада *L1-L5* (и то у вредностима моларности од 0,3 μ M до 100 μ M). Поред ових једињења, на исти начин (при истим моларностима, трајању култивације и на истим популацијама ћелија) смо тестирали утицај цисплатине, као референтног цитостатика. Цисплатину смо тако искористили као позитивну контролу у нашим експериментима.

Принцип МТТ теста је следећи. Приближно идентичан број ћелија од по око 5000 ћелија је након подизања трипсином из фласкова где су те ћелије биле култивисане, засејаван у појединачне бунаре микротитар плоча од 96 бунара. Тако засејане ћелије које су претходно биле у експоненцијалној фази раста су остављане у микротитар плочама 24 сата у инкубатору на 37 $^{\circ}$ C и 5% *CO*₂ да би се залепиле за микротитар плоче. Потом смо ћелије третирали растућом количином комплекса *C1-C5* и лиганада *L1-L5* од 0,3 до 100 μ M. Свака појединачна моларност је испитана у триплекату (у три бунара микротитар плоче) и у три различита понављања (у три одвојена експеримента) са ћелијама различитих пасажа. У одређени број бунара је додаван само комплетан медијум и ти бунари су били контролни. Третман испитиваним супстанцама је трајао 24, 48 или 72 сата, после чега би се аспирирао супернатант и додао 10%-ни раствор тетразолијум-бромида у *PBS*-у од 0,5 mg/ml . Преосталих 90% овог раствора је чинио чист медијум без серума. Након 2 сата раста у условима *in vitro* ћелија у оваквом раствору у инкубатору на 37 $^{\circ}$ C и 5% *CO*₂, поново би се подизао супернатант и додало би се по 200 μ L *DMSO*-а у сваки бунарчић микротитар плоче. Плоче би се лагано промешале, да би се растворили кристали формазана у *DMSO*-у и апсорбанца би се читавала на *ELISA*-читачу у року од највише 30 минута. Мерили смо апсорбанцу на 595 *nm*. Након тога смо рачунали стопу преживљавања ћелија по следећој формули:

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

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

Вредност цитотоксичности смо рачунали по формули:

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

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

Поред ових вредности, од интереса нам је била такозвана IC_{50} вредност односно вредност половине максималне инхибиторне моларне концентрације. Ову вредност смо рачунали користећи линеарну или логаритамску регресију зависно од типа биолошког одговора на једињење и уз помоћ програма *Microsoft Office Excel*-а 2010 по претходно описаној методологији.

3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ РЕЛАТИВНОГ ОДНОСА ЋЕЛИЈА КОЈЕ СЕ НАЛАЗЕ У АПОПТОЗИ И НЕКРОЗИ (*Annexin V/PI* тест)

Након што бисмо одредили ефекат новосинтетисаних комплекса паладијума(II) $C1-C5$ и лиганада $L1-L5$ на стопу преживљавања два различита типа ћелија тумора простате $PC-3$ и $DU-145$, као и $MRC-5$ фибробласта, следећи корак нашег истраживања је био да ближе дефинишемо начин деловања претходно споменутих једињења. Стога смо тестирали како заправо паладијум(II) једињења, $C1-C5$ делују на релативни однос ћелија у апоптози и некрози применом *Annexin V/PI* теста и мерењем тог односа проточном цитометријом.

Ћелије које смо тестирали на овај начин су биле два различита типа ћелија тумора простате $PC-3$ и $DU-145$.

Сам принцип овог теста се заснива на двоструком бојењу ћелија које су претходно третиране концентрацијом комплекса $C1-C5$ која одговара IC_{50} вредности. Очекивано је да половина популације ћелија након третмана не буде више вијабилно. Захваљујући чињеници да ћелије које упадају у апоптозу имају карактеристику да остаци фосфатидил-серина њихових ћелијских мембрана бивају окренути ка спољашњој средини, код апоптотичних ћелија се за те остатке фосфатидил-серина може везати молекула који се назива анексин (*Annexin V*). Баш због тога, све ћелије које се налазе у различитим фазама програмиране ћелијске смрти, било раној, било касној, су анексин позитивне. Да би се детектовао проточном цитометријом, за анексин је претходно везана флуоресцентна боја која емитује флуоресценцију у спектру зелене боје, флуоресцеин-изотиоцијанат (*FITC*). На сличан начин, пропидијум-јодид (*PI*), који је наранцасто-црвенкасте боје, се може везати за ћелије. Као што везивање анексина за ћелију прави разлику између анексин-позитивних, односно апоптотских и анексин-негативних односно ћелија које нису у апоптози, тако и везивање пропидијум-јодида за једно прави разлику између пропидијум-јодид позитивних односно мртвих и пропидијум-јодид негативних, односно живих ћелија. Наиме, ћелије које имају интактну ћелијску мембрану не везују пропидијум-јодид, јер се он везује за једно.

Можемо закључити да су анексин негативне и пропидијум-јодид негативне ћелије живе (вијабилне), анексин позитивне и пропидијум-јодид негативне ћелије оне ћелије које се налазе у раној апоптози, анексин позитивне и пропидијум-јодид позитивне ћелије

оне које су у стадијуму касне апоптозе, а анексин негативне и пропидијум-јодид позитивне ћелије, оне ћелије које су некротичне.

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

Ова метода се изводи на следећи начин:

- Након 24-часовног третмана ћелија које су претходно третиране концентрацијом комплекса *C1-C5* која одговара њиховим IC_{50} вредностима или су култивисане у комплетном медијуму (контрола) ћелије су подигнуте, затим у више наврата испране у ледено хладном *PBS*-у и растворене у пуферу за везивање ћелија (*Binding buffer*) у концентрацији од 10^6 ћелија/*mL*.
- Потом је по 100 *mL* суспензије ћелија пребачено у по три епрувете запремине 5 *mL* (пошто смо радили три експеримента и у трипликату)
- У сваку епрувету смо додали по 5 *mL* анексина (*Annexin V-FITC*) и 5 *mL* пропидијум-јодида (*PI*)
- Кратко смо вортексовали ћелије и инкубирали смо епрувете 15 минута у мраку на собној температури
- На крају смо додали још по 400 *mL* пуфера за везивање ћелија и читавали резултате на проточном цитометру.

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

3.5. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Следећи корак нашег истраживања је био да ближе испитамо начин деловања паладијума(II) *C1-C5* на ћелијски циклус *PC-3* и *DU-145* ћелија. Желели смо да утврдимо да ли се третиране туморске ћелије понашају идентично као нетретиране, тј. да ли се успорава брзина деобе туморских ћелија под утицајем ових једињења.

Стога смо тестирали којим механизмом комплекси паладијума(II) *C1-C5* имају ефекат на релативни однос ћелија које се налазе у одређеним стадијумима ћелијског циклуса применом *PI* бојења и мерењем тог односа проточном цитометријом.

Сам принцип овог теста се заснива на способности молекула пропидијум-јодида да се веже за молекулу ДНК. На основу интензитета флуоресценције коју емитују тако везани молекули пропидијум-јодида у свакој појединачној ћелији, можемо одредити у којој фази ћелијског циклуса се обојене ћелије налазе. Ћелије које су диплоидне ($2n$) су заправо ћелије које припадају популацији ћелија у *G0/G1* фази, а ћелије које имају мање од диплоидног садржаја ДНК ($<2n$) су ћелије које се налазе у програмираној ћелијској смрти. С друге стране, ћелије у које се налазе у *S* фази карактерише повишена количина ДНК од диплоидног ($2n$ и $4n$). Оне ћелије које се налазе унутар *G2/M* фазе ћелијског циклуса садрже двоструко већу количину молекула ДНК од диплоидног, односно у њиховим једрима је присутна „квадриплоидна“ количина молекула ДНК ($4n$).

Протокол за анализу ћелијског циклуса је био следећи:

Први корак је био третман испитиваних туморских ћелија (у трајању од 24 сата концентрацијом комплекса паладијума(II) *C1-C5* која је одговарала њиховој *IC₅₀* вредности или се радило о контролној популацији нетретираних ћелија које су култивисане 24 сата само у комплетном медијуму за ћелијске културе. Ћелије које смо тестирали на овај начин су биле два различита типа ћелија тумора простате *PC-3* и *DU-145*.

Након тога смо обе групе ћелија, дакле и третиране и контролне, подигли, односно трипсинизовали и једном опрали медијумом и два пута фосфатним пуфером.

Потом смо ћелије фиксирали ледено хладним 70%-им етанолом и држали их у етанолу на 4°C најмање 1 сат (у просеку смо их држали 20-ак часова).

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

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

3.6. АНАЛИЗА КЉУЧНИХ ПРОТЕИНА АПОПТОЗЕ

Процес апоптозе може бити активиран на два начина: спољашњим и унутрашњим путем апоптозе. Да бисмо прецизније одредили механизам деловања испитиваних комплекса паладијума(II), мерили смо активност, односно концентрацију активних форми кључних протеина апоптозе. Ћелије које смо тестирали на овај начин су биле два различита типа ћелија тумора простате *PC-3* и *DU-145*, а протеини од значаја које смо анализирали у овим експериментима су били један проапоптотични протеин, конкретно у овом случају активни *bax* и један антиапоптотски протеин *bcl-2*. Поред ових протеина који су укључени у унутрашњи пут апоптозе, тестирали смо да ли долази до активације каскаде каспаза, тј. да ли је апоптоза каспаза зависна, мерењем присуства активне каспазе-3.

Основна сврха ових експеримената је био да се детаљно докаже да ли се третиране туморске ћелије понашају идентично као нетретиране, тј. да ли се мења активност и/или количина активiranог протеина *bax-a*, *bcl-2* и активирани каспазе-3 под утицајем комплекса паладијума(II) *C1-C5*.

Реагенси коришћени у овим експериментима су били следећи:

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

- Секундарно обележено флуоресцеин-изотиоцијанатом (*FITC*) антителио за необележена примарна антителиа - *Abcam*™ *secondary goat anti-rabbit IgG-FITC antibody*, *Catalog number: Ab6717-1*

Сва примарна антителиа су коришћена у разблажењу 1:1000, а секундарно антителио у разблажењу 1:2000.

Протокол за анализу кључних протеина апоптозе је био следећи:

Први корак је био третман испитиваних туморских ћелија (у трајању од 24 сата концентрацијом комплекса паладијума(II) *C1-C5* која је одговарала њиховој *IC₅₀* вредности или се радило о контролној популацији нетретираних ћелија које су култивисане 24 сата само у комплетном медијуму за ћелијске културе. Ћелије које смо тестирали на овај начин су биле два различита типа ћелија тумора простате *PC-3* и *DU-145*.

Након тога смо обе групе ћелија, дакле и третиране и контролне, подигли, односно трипсинизовали и једном опрали медијумом и два пута ледено хладним фосфатним пуфером.

Након фиксације и пермеабилizације у складу са упутством произвођача реагенаса, неспецифично везивање антителиа смо блокирали додавањем козјег серума. Затим је додавано одговарајуће примарно и уколико примарно антителио није било обележено, додавали смо и секундарно обележено антителио.

После раста у условима *in vitro* у мраку од 30 минута на собној температури, додавали бисмо још 300 μ l фосфатног пуфера и читавали смо резултате на проточном цитометру.

Стандардизација интензитета флуоресценције је извршена употребом антителиа које се користи за негативну изотипску контролу. Израчунавање просечног интензитета флуоресценције ћелија које смо мерили проточном цитометријом (*Mean Fluorescence Intensity - MFI*) за протеине *bax* и протеин *bcl-2* је извршено рачунањем односа интензитета флуоресценције мереног молекула (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле. Евалуација количине каспазе-3 у тестираним и нетретираним ћелијским линијама тумора простате *PC-3* и *DU-145* је спроведена тако што смо анализирали процентуалан број ћелија које испољавају флуоресценцију на протеин активна каспаза-3.

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

3.7. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА И ПРЕЗЕНТАЦИЈА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА

Први корак у статистичкој анализи наших резултата је увек био рачунање дистрибуције података. Зависно од тога да ли су подаци били дистрибуирани нормално или не, вршен је одабир статистичког теста. Зависност ефекта лека од његове концентрације је испитивана методама линеарне или логистичке регресије у складу са типом зависности резултата мерења. Вредност *p* која је била мања од 0,05 је узимана за сигнификантну (статистички значајну) и приказивана је као “*” на графицима. Статистички програм коришћен у анализи добијених резултата је био *SPSS v20*. Сви резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна девијација, уколико је дистрибуција података била нормална или као медијана \pm стандардна грешка, уколико дистрибуција није била нормална. Сви експерименти су рађени у трипликату, као и у три независна експеримента, при чему смо увек користили ћелијске линије у експоненцијалној фази раста и у различитим пасажама. Резултати су приказани графички, као стубичасти, тачкасти или линеарни дијаграми или табеларно.

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати обухватају одређивање цитотоксичних ефеката *Pd(II)* комплекса на малигне ћелије као и на ћелије малигно неизмењених фибробласта. Прецизније, испитивани су цитотоксични ефекти пет паладијум комплекса обележених *C1-C5*, као и одговарајућих лиганата обележених *L1-L5*.

Испитиван је и цитотоксични ефекат цисплатине на туморске и малигно неизмењене ћелије у циљу поређења са цитотоксичним ефектима комплекса паладијума и одговарајућих лиганата. Ефекат на стопу преживљавања туморских ћелија комплекса паладијума, одговарајућих лиганата и цисплатине одређиван је применом МТТ теста у временским интервалима од 24, 48 и 72 часа.

4.1 АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ЛИГАНАДА И ЦИСПЛАТИНЕ НА СТОПУ ПРЕЖИВЉАВАЊА (ВИЈАБИЛНОСТ) ЋЕЛИЈА ЕПИТЕЛНОГ АДЕНОКАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ *PC-3*

Резултати су недвосмислено показали да након третмана комплексом паладијума *C1* долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања *PC-3* ћелија у временском периоду од 24 часа раста у условима *in vitro* при моларностима већим од 10 μ М. Прецизније, за 10 μ М моларност стопа преживљавања *PC-3* ћелија је достигла 62,7 \pm 4,9%, за 30 μ М моларност стопа преживљавања је достигла 43,9 \pm 1,7% и финално за моларност од 100 μ М стопа преживљавања туморских ћелија која је забележена износи 40,7 \pm 4,3%. ($p<0,05$, графикон 1). Насупрот томе, након третирања *PC-3* ћелија паладијум комплексом *C1* у моларностима нижим од 10 μ М није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања ($p>0,05$).

Након третмана комплексом паладијума *C2*, дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања *PC-3* ћелија у моларностима вишим од 30 μ М. Прецизније, за моларност од 30 μ М стопа преживљавања *PC-3* ћелија је достигла 52 \pm 4,8%, за моларност од 100 μ М стопа преживљавања малигних ћелија је достигла 36,2 \pm 2,5 % ($p<0,05$, графикон 1). Такође, након третмана *PC-3* ћелија комплексом *C1* паладијума у моларностима нижим од 30 μ М није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија ($p>0,05$).

Након 24-часовног третмана *PC-3* ћелија паладијум комплексом *C3*, показано је сигнификантно умањење стопе преживљавања при моларности од 100 μ М. Прецизније, за моларност од 100 μ М стопа преживљавања *PC-3* ћелија је достигла 43,2 \pm 3,2% ($p<0,05$, графикон 1). Приликом третмана малигних ћелија моларностима нижим од 100 μ М није показано сигнификантно умањење стопе преживљавања ($p>0,05$).

Током испитивања цитотоксичног ефекта комплекса паладијума *C4* уочено је сигнификантно умањење стопе преживљавања *PC-3* ћелија већ при моларности од 30 μ М. Прецизније, при моларности од 30 μ М стопа преживљавања *PC-3* ћелија је достигла 57,7 \pm 4,5%. Даље, при моларности од 100 μ М стопа преживљавања туморских ћелија је износила 47,8 \pm 4,6 % ($p<0,05$, графикон 1). Након третмана *PC-3* ћелија у моларностима мањим од 30 μ М није дошло до сигнификантног умањења малигних ћелија у односу на контролне нетретиране ћелије ($p>0,05$).

Приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса паладијума *C5* показано је сигнификантно умањење стопе преживљавања *PC-3* малигних ћелија при моларности од 30 μ М. Већ при моларности од 30 μ М стопа преживљавања туморских ћелија је достигла 69,2 \pm 1,7%. Након третмана малигних ћелија комплексом *C5* при моларности

од 100 μ M стопа преживљавања је износила $42,3 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$, графикон 1). При моларностима мањим од 30 μ M није дошло до сигнификантног умањења *PC-3* ћелија у односу на контролне нетретирание ћелије ($p > 0,05$).

Након третмана *PC-3* ћелија растућим моларностима цисплатине, показано је сигнификантно умањење стопе преживљавања при моларности од 100 μ M, стопа преживљавања малигних ћелија је износила $45,1 \pm 3,7\%$ ($p < 0,05$, графикон 1). При моларностима цисплатине нижим од 100 μ M није показана статистички значајна промена стопе преживљавања *PC-3* ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Након 24-часовне култивације *PC-3* ћелија и третмана лигандом *L1*, није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија при испитиваним моларностима које су износиле 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M ($p > 0,05$).

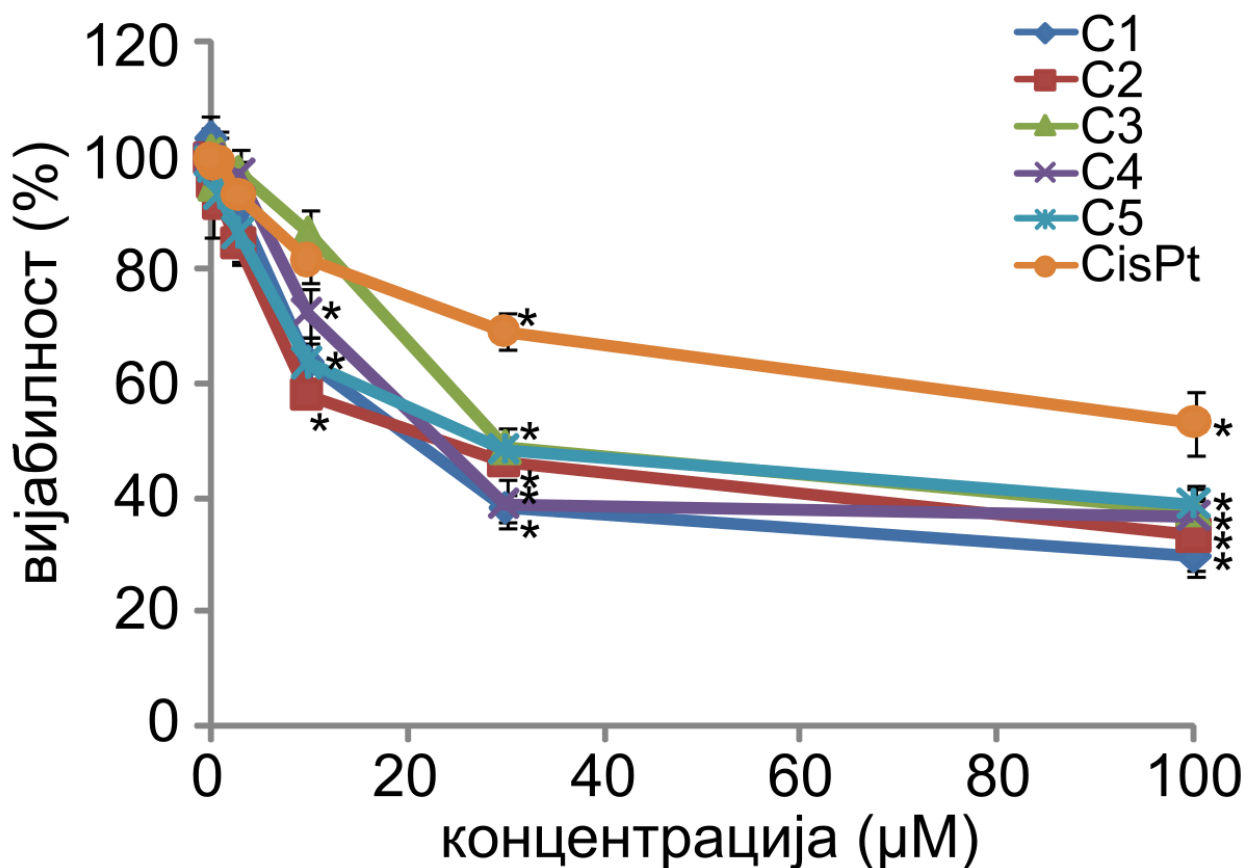
Током испитивања цитотоксичног ефекта на ћелије карцинома простате *PC-3* и у присуству растућих вредности моларности лиганда *L2*, није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате у односу на контролне нетретирание ћелије ($p > 0,05$).

Лиганд *L3* није сигнификантно умањено стопу преживљавања туморских *PC-3* ћелија након 24 часа третмана, при испитиваним моларностима од 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M ($p > 0,05$).

При испитиваним моларностима лиганда *L4* (0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M) није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних *PC-3* ћелија након 24-часа култивације ($p > 0,05$).

Такође, након третмана лигандом *L5* јасно је показано да није дошло до сигнификантног умањења *PC-3* ћелија при испитиваним моларностима од 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M ($p > 0,05$).

Можемо закључити да након 24-часовног третмана *PC-3* ћелија одговарајућим лигандима није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања тестираних ћелија. У прилог томе нам говоре високе приказане IC_{50} вредности за лиганде (табела 1).



Графикон 1. Утицај растућих моларних концентрација (до 100μM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) **C1-C5** и цисплатине (**CisPt**) на стопу преживљавања ћелија карцинома простате *PC-3* након 24 сата раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије.

IC_{50} (μM)	PC3		
	24h	48h	72h
L1	> 200	>200	> 200
L2	> 200	> 200	> 200
L3	> 200	> 200	> 200
L4	> 200	> 200	> 200
L5	> 200	> 200	> 200

Табела 1. IC_{50} вредности одговарајућих лиганата **L1-L5** за тестиране *PC-3* ћелије.

Након раста у условима *in vitro* од 48-часова испитиваних PC-3 ћелија са паладијум комплексом C1, до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија дошло је након имплементације комплекса C1 моларном концентрацијом од 3 μ M. При моларности C1 комплекса од 3 μ M стопа преживљавања малигних ћелија је умањена на 74,5 \pm 2,7%. Умањење стопе преживљавања PC-3 ћелија је показало статистичку значајност и при моларностима од 30 μ M и 100 μ M и забележено је 31,3 \pm 4,2 %, и 55,6 \pm 3,4% ($p < 0,05$, графикон 2). При моларностима од 1 μ M и 0,3 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Када говоримо о цитотоксичном ефекту C2 комплекса паладијума на PC-3 ћелијској линији, до сигнификантног умањења стопе преживљавања дошло је већ при моларности од 10 μ M. Прецизније при моларности комплекса C2 од 10 μ M дошло је до умањења стопе преживљавања на 51,1 \pm 3,3%. Даље, при моларностима C2 од 30 μ M и 100 μ M такође је дошло до статистички значајног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). Приликом третирања малигних ћелија моларностима комплекса паладијума од 3 μ M, 1 μ M и 0,3 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија ($p > 0,05$).

Након третмана комплексом паладијума C3 и раста у условима *in vitro* од 48-часова до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија дошло је при моларности од 30 μ M. Тачније, при моларности C3 комплекса од 30 μ M, стопа преживљавања малигних ћелија је умањена на 41,6 \pm 2,5%. Даље, при моларностима C3 комплекса од 100 μ M такође, долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). Насупрот томе, при моларностима C3 комплекса од 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија ($p > 0,05$).

При тестираним моларностима комплекса C4 након 48-часовне раста у условима *in vitro*, до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 је дошло при моларности од 10 μ M. Након третмана малигних ћелија концентрацијом C4 од 10 μ M стопа преживљавања је износила 65,4 \pm 3,1%. Такође, након третмана PC-3 ћелија моларностима C4 од 30 μ M и 100 μ M дошло је до сигнификантног умањења туморских ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). При моларностима C4 од 0,3 μ M, 1 μ M и 3 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија ($p > 0,05$).

Испитивањем цитотоксичног ефекта комплекса паладијума C5, недвосмислено је показано да долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија већ при моларности од 3 μ M и износи 75,5 \pm 1,8%. Такође, након третмана PC-3 ћелија моларностима C5 комплекса од 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија ($p < 0,05$, графикон 2). Даље, при вредностима моларности комплекса паладијума C5 од 0,3 μ M и 1 μ M није дошло до статистички значајног умањења стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Испитивањем цисплатине након 48-часовне култивације јасно је демонстрирано да долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања PC-3 ћелија већ при моларности од 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 2). Насупрот томе при моларности цисплатине од 0,3 μ M, 1 μ M и 3 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија ($p > 0,05$).

Након 48-часовне култивације *PC-3* ћелија и у присуству растућих вредности моларности лиганда *L1* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *PC-3* малигних ћелија ($p>0,05$).

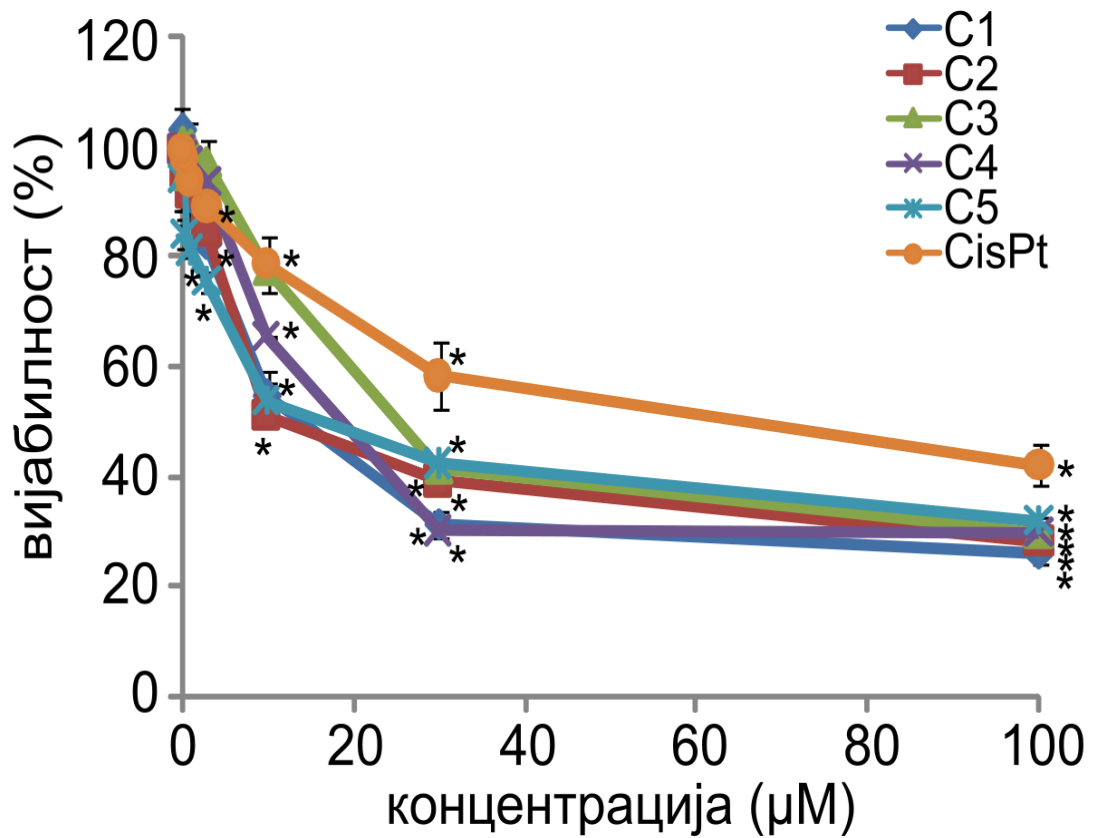
Такође, испитивањем цитотоксичности лиганда *L2* након 48-часовне раста у условима *in vitro* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија ($p>0,05$).

Лиганд *L3* у моларностима 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M није показао снажан цитотоксични ефекат. Прецизније, при претходно наведеним моларностима није дошло до сигнификантног пада стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p>0,05$).

Након тестираних моларних концентрација лиганда *L4* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија, након 48-часовне култивације у односу на контролу, нетретиране малигне ћелије ($p>0,05$).

Одговарајући и тестирани лиганд *L5* при испитиваним моларностима није показао снажан цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелија. Стога, није дошло до сигнификантног смањења стопе преживљавања малигних ћелија карцинома простате ($p>0,05$).

Можемо закључити да након 48-часовног третмана *PC-3* ћелија одговарајућим лигандима није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања тестираних ћелија. У прилог томе нам говоре високе приказане IC_{50} вредности за лиганде (табела 1).



Графикон 2. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања ћелија карцинома простате PC-3 након 48 сати раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије.

Када је испитиван ефекат комплекса паладијума *C1* након култивације *PC-3* ћелија у трајању од 72 часа јасно је уочено да већ при моларности од 3 μ M долази до статички значајног умањења стопе преживљавања која износи $70,6 \pm 3,2\%$. Међутим, када се комплекс *C1* имплементира у моларностима од 0,3 μ M и 1 μ M није забележено сигнификантно умањење стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p > 0,05$). Стога, јасно је да при моларностима вишим од 3 μ M (10 μ M, 30 μ M и 100 μ M) такође долази до статистички значајне промене стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p < 0,05$, графикон 3).

Такође, када је испитивано цитотоксично дејство комплекса *C2* на туморске ћелије карцинома простате (након 72 часа култивације), показано је да при вредности моларности од 3 μ M долази до статистички значајне промене стопе преживљавања ($74,5 \pm 2,2\%$). Даље, при моларностима вишим од 3 μ M долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија ($p < 0,05$, графикон 3). Са друге стране, при моларностима комплекса *C2* од 0,3 μ M и 1 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања ($p > 0,05$).

Након 72 часа култивације *PC-3* ћелија карцинома простате у присуству комплекса *C3* при моларности од 10 μ M дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања ћелија карцинома простате. При моларностима *C3* нижим од 10 μ M, није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p > 0,05$). Супротно, при моларностима *C3* вишим од 10 μ M дошло је до статистички значајне промене стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p < 0,05$, графикон 3).

Приликом 72 часа култивације малигних ћелија комплекс паладијума *C4* је показао снажан цитотоксични ефекат, односно дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања *PC-3* ћелија при моларности од 3 μ M. Такође, при моларностима *C4* вишим од 3 μ M дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија ($p < 0,05$, графикон 3). Насупрот томе, при моларностима комплекса *C4* од 0,3 μ M и 1 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p > 0,05$).

Комплекс паладијума *C5* је показао снажан цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелије, након 72 часа раста у условима *in vitro*. До сигнификантног умањења стопе преживљавања је дошло при моларности *C5* од 3 μ M ($p < 0,05$, графикон 3). При моларностима *C5* мањим од 3 μ M не долази до статистички значајне промене стопе преживљавања малигних ћелија. Такође, при већим моларностима *C5* од 3 μ M долази до сигнификантног умањења вијабилности туморских ћелија ($p < 0,05$, графикон 3).

Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине након 72 часа култивације, резултати су показали да до сигнификантног умањења стопе преживљавања *PC-3* ћелија долази при моларности од 3 μ M ($p < 0,05$, графикон 3). Стога, моларности цисплатине више од 3 μ M су такође показале статистички значајну промену стопе преживљавања малигних ћелија.

За разлику од претходно наведених комплекса паладијума, лиганд *L1* након 72 часа раста у условима *in vitro* *PC-3* ћелија је показао изразито слаб цитотоксични ефекат, односно није дошло до статистички значајног умањења стопе преживљавања малигних ћелија након третмана растућим моларностима ($p > 0,05$).

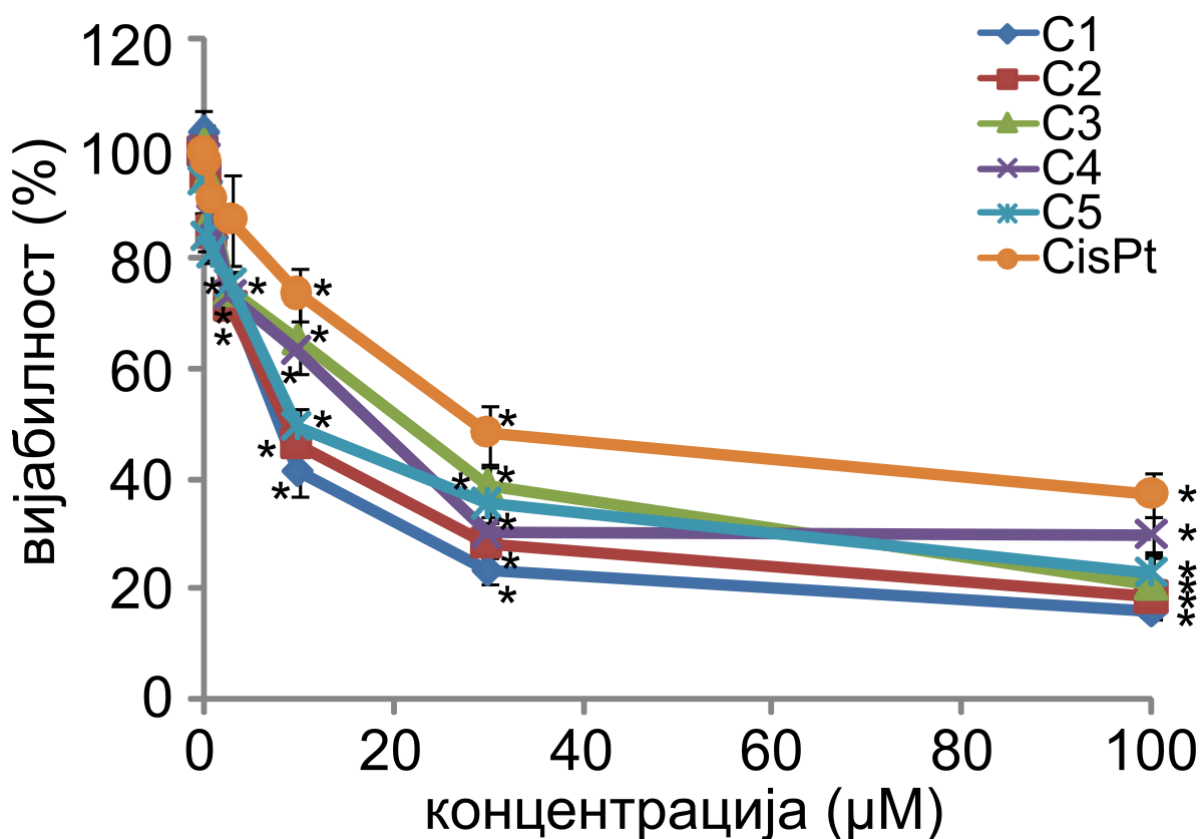
Исто као и лиганд *L1*, након третмана малигних ћелија лигандом *L2*, након 72 часа раста у условима *in vitro* није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања испитиваних малигних *PC-3* ћелија ($p > 0,05$).

Приликом 72 часа култивације, након третмана малигних ћелија одговарајућим моларностима лиганда *L3* није дошло до дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија ($p>0,05$).

Испитивањем цитотоксичног ефекта лиганда *L4* јасно је показано да не долази до сигнификантног смањења вијабилности *PC-3* ћелија након 72 часа култивације ($p>0,05$).

Лиганд *L5* је показао изразито слаб цитотоксични ефекат на малигне ћелије карцинома простате, стога након 72 часа раста у условима *in vitro* није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања *PC-3* ћелија ($p>0,05$).

Можемо јасно закључити да су комплекси паладијума *C1-C5* показали снажан цитотоксични ефекат на ћелије карцинома простате *PC-3* након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* са ниским израчунатим IC_{50} вредностима (табела 2), док су одговарајући лиганди показали изразито слаб цитотоксични ефекат на малигне ћелије. Ове чињенице нам јасно указују да је неопходно присуство метала паладијума како би се постигло сигнификантно умањење стопе преживљавања *PC-3* ћелија.



Графикон 3. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања ћелија карцинома простате PC-3 након 72 сата раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретирание ћелије.

IC_{50} (µM)	PC3		
	24h	48h	72h
C1	28.47±2.42	14.83±1.38	6.31±1.6
C2	28.99±2.34	17.9±1.53	8.56±0.73
C3	90.74±7.41	41.82±2.61	17.81±1.23
C4	43.2±3.69	23.01±1.4	12.68±1.29
C5	43.38±3.17	17.73±1.46	9.13±1.63
Cisplatin	97.96±8.02	75.49±5.14	49.4±8.21

Табела 2. IC_{50} вредности одговарајућих комплекса палдијума C1-C5 за тестиране PC-3 ћелије.

4.2. ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ОДГОВАРАЈУЋИХ ЛИГАНДА И ЦИСПЛАТИНЕ НА СТОПУ ПРЕЖИВЉАВАЊА ЋЕЛИЈА ЕПИТЕЛНОГ АДЕНОКАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ DU-145

Након испитивања ефекта паладијум комплекса C1 на DU-145 ћелијској линији карцинома простате показано је да је дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања при вредностима моларности од 100 μ M, 30 μ M и 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 4). Међутим, када се C1 комплекс паладијума апликује у концентрацијама од 0,3 μ M, 1 μ M и 3 μ M, не долази до статистички значајне промене стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Приликом 24-часовне раста у условима *in vitro* и третмана паладијум комплексом C2 у моларностима које су износиле 100 μ M, 30 μ M и 10 μ M, недвосмислено је демонстрирано сигнификантно умањење стопе преживљавања DU-145 малигнућ ћелија ($p < 0,05$, графикон 4). Насупрот томе, након третмана малигнућ ћелија комплексом C2 у нижим моларностима од 10 μ M (0,3 μ M, 1 μ M и 3 μ M) није демонстрирано сигнификантно умањење стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија ($p > 0,05$).

Комплекс паладијума C3 је показао након 24 часа култивације показао сигнификантно умањење стопе преживљавања DU-145 малигнућ ћелија при моларности од 100 μ M, 30 μ M и 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 4). Моларна концентрација комплекса C3 испод 10 μ M није довела до сигнификантног умањења стопе преживљавања ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Након 24 часа култивације комплекс C4 је показао сигнификантно умањење стопе преживљавања туморских ћелија при вредностима моларности од 100 μ M, 30 μ M и 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 4). Као и код претходно наведених комплекса паладијума, паладијум комплекс C4 у моларностима нижим од 10 μ M није сигнификантно умањивао стопу преживљавања DU-145 малигнућ ћелија ($p > 0,05$).

Комплекс паладијума C5 показао је снажан антитуморски ефекат на малигне ћелије карцинома простате. Након 24 часа раста у условима *in vitro* паладијум комплекс C5 је показао статистички значајан пад стопе преживљавања DU-145 малигнућ ћелија при вредностима моларности од 100 μ M, 30 μ M и 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 4). Међутим, при нижим моларностима комплекса паладијума C5 од 10 μ M није дошло до сигнификантног умањења туморских ћелија ($p > 0,05$).

Испитивана цисплатина је сигнификантно умањива стопу преживљавања DU-145 малигнућ ћелија при максималној моларности од 100 μ M, при чему је стопа преживљавања испитиваних малигнућ ћелија износила $77 \pm 2,8\%$ ($p < 0,05$, графикон 4). При моларностима нижим од 100 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија ($p > 0,05$).

Након тестирања одговарајућег лиганда L1, није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања DU-145 малигнућ ћелија при моларностима 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M ($p > 0,05$).

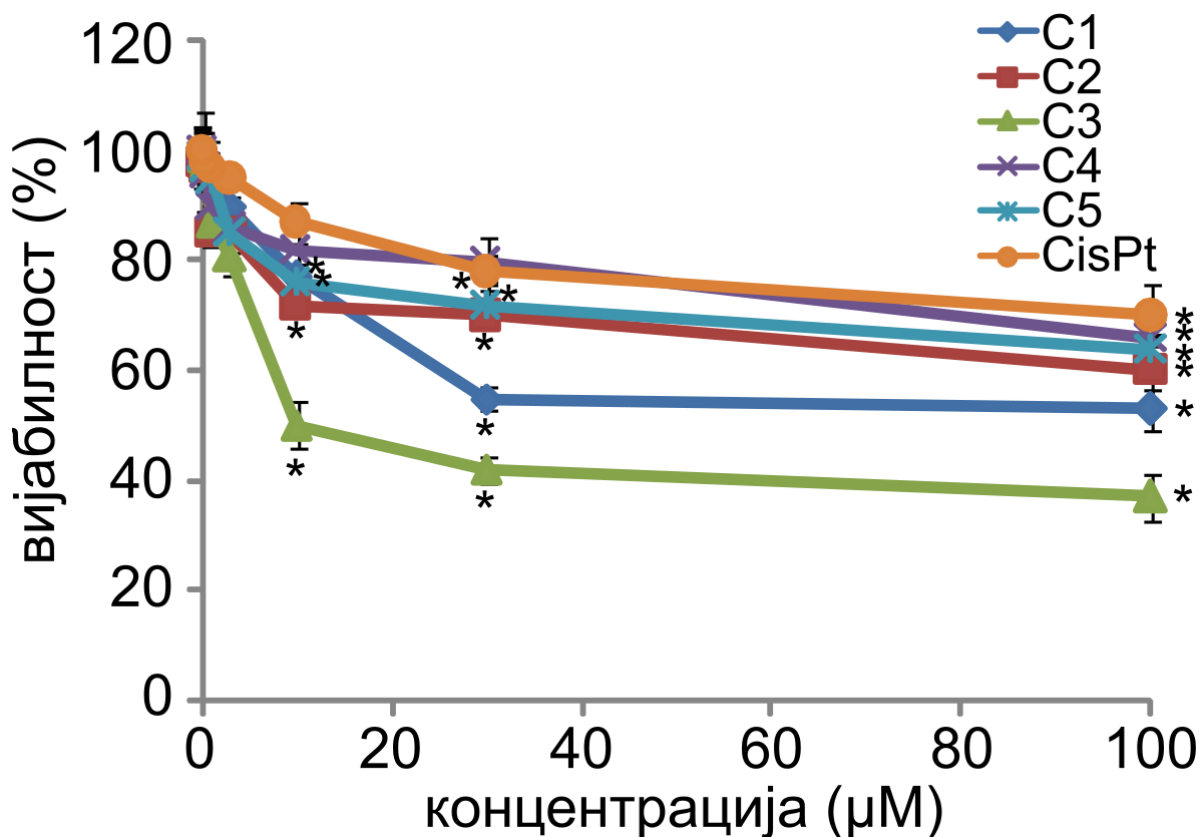
Такође, лиганд обележен као L2 након 24 часа раста у условима *in vitro*, а у присуству растућих вредности моларности није довео до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Тестирани лиганд *L3* није показао сигнификантно умањење стопе преживљавања *DU-145* ћелија, у присуству растућих вредности моларности након 24 часа култивације испитваних малигних ћелија ($p>0,05$).

Испитивањем цитотоксичног ефекта лиганда *L4* у моларностима од 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M, доказано је да лиганд *L4* не доводи до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигних ћелија карцинома простате *DU-145* након 24 часа култивације ($p>0,05$).

Као и сви претходно наведени лиганди, лиганд *L5* након 24 часа раста у условима *in vitro* није показао снажан цитотоксични ефекат на туморске ћелије. Стога, није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигних ћелија у присуству растућих вредности моларности одговарајућег лиганда ($p>0,05$).

Можемо закључити да сви испитивани лиганди након 24 часа раста у условима *in vitro* ћелија нису довели до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигних ћелија, што се карактерише и високим IC_{50} вредностима (табела 3).



Графикон 4. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања ћелија карцинома простате DU145 након 24 сата раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретирани ћелије.

IC_{50} (µM)	DU-145		
	24h	48h	72h
L1	> 200	>200	> 200
L2	> 200	> 200	> 200
L3	> 200	> 200	> 200
L4	> 200	> 200	> 200
L5	> 200	> 200	> 200

Табела 3. IC_{50} вредности одговарајућих лиганата L1-L5 за тестиране DU-145 ћелије.

Након 48 часа култивације малигнух ћелија комплекс паладијума *C1* показао је сигнификантно умањење стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате, у вредностима моларности од 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M ($p < 0,05$, графикон 5). При моларностима *C1* нижим од 10 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања туморских ћелија ($p > 0,05$).

Комплекс паладијума *C2* је показао снажан цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелијску линију. Након 48 часова култивације, при моларности комплекса *C2* од 10 μ M дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања ћелија карцинома простате, при чему је стопа преживљавања износила $65,7 \pm 6,4\%$ ($p < 0,05$, графикон 5). При вишим вредностима моларности од 30 μ M и 100 μ M такође је дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* ћелија. Насупрот томе, при моларностима *C2* комплекса паладијума нижим од 10 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Тестирани комплекс паладијума *C3* након 48 часова раста у условима *in vitro*, показао је снажан цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелијску линију. До сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија дошло је при моларности *C3* од 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 5). Такође, до сигнификантног умањења стопе преживљавања ћелија карцинома простате дошло је при моларности *C3* од 30 μ M и 100 μ M. Међутим, при моларностима комплекса *C3* мањим од 30 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања ћелија карцинома простате ($p > 0,05$).

Третирањем комплексом *C4* резултати су показали да при вредностима моларности од 10 μ M и 30 μ M долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигнух ћелија ($p < 0,05$, графикон 5). Такође, при третирању туморских ћелија карцинома простате комплексом *C4* моларностима нижим од 10 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања малигнух ћелија ($p > 0,05$).

Комплекс паладијума *C5* је демонстрирао статистички значајан пад стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате већ при моларности од 10 μ M ($p < 0,05$, графикон 5). При апликацији туморских ћелија комплексом *C5* у моларностима нижим од 10 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања малигнух ћелија ($p > 0,05$).

Приликом испитивања цитотоксичног ефекта цисплатине, након 48 часова култивације, показано је да при вредностима моларности од 10 μ M и 30 μ M долази до статистички значајне промене стопе преживљавања ћелија карцинома простате ($p < 0,05$, графикон 5). При моларностима цисплатине нижим од 10 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* ћелијске линије ($p > 0,05$).

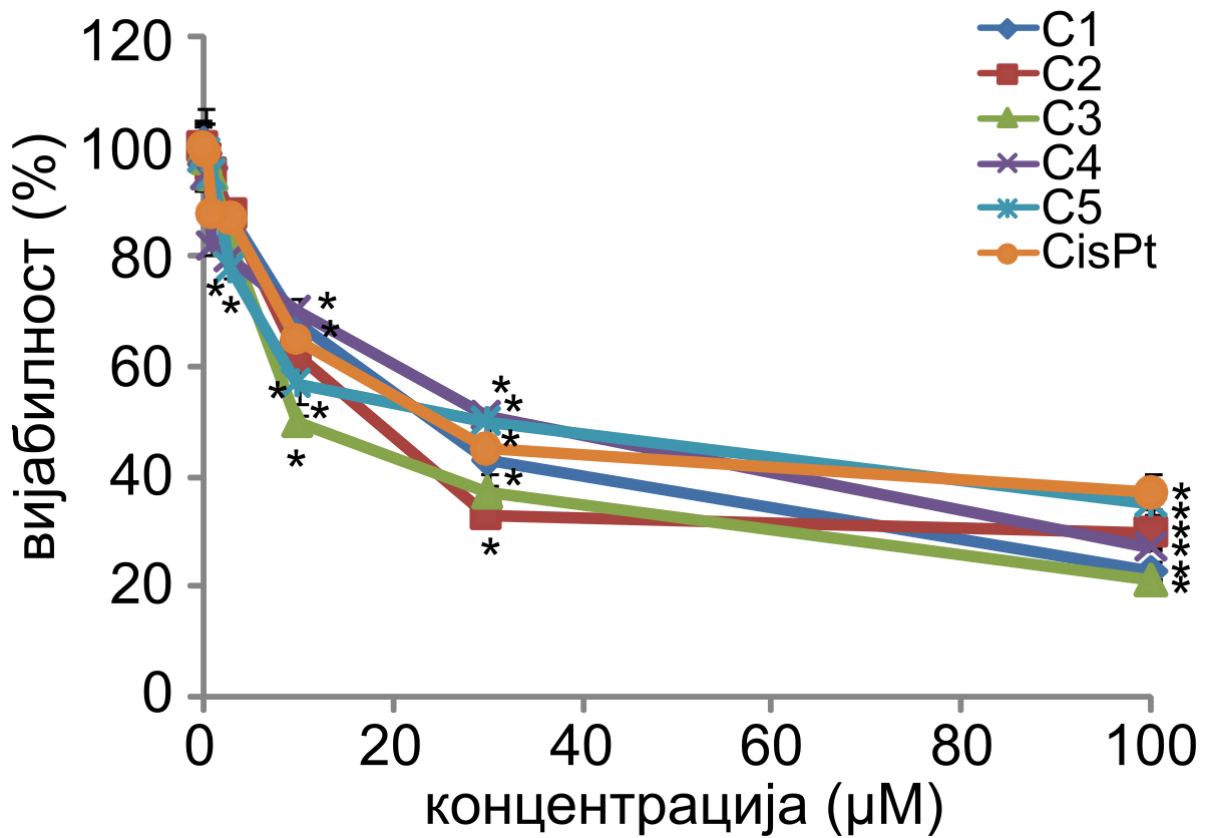
Након 48-часовне раста у условима *in vitro* *DU-145* малигнух ћелија лиганд *L1* показао је веома слаб цитотоксични ефекат на туморске ћелије. Прецизније, у растућим моларностима одговарајући лиганд *L1* није довео до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно измењених ћелија ($p > 0,05$).

Наша студија је показала да применом лиганда *L2* у испитиваним моларностима није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигнух ћелија након 48-часовне раста у условима *in vitro* ($p > 0,05$).

Исто тако, лиганд *L3* није показао снажан цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелијској линији. Можемо јасно закључити да применом лиганда *L3* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате након 48-часовне раста у условима *in vitro* ($p>0,05$).

Након 48 часова култивације *DU-145* ћелија при моларностима лиганда *L4* од 0,3 μ М, 1 μ М, 3 μ М, 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија карцинома простате ($p>0,05$).

Као и сви претходно наведени лиганди, лиганд *L5* је показао веома слаб цитотоксични ефекат на испитиваној *DU-145* ћелијској линији. Стога, у присуству растућих вредности моларности лиганда *L5* није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања испитиваних ћелија карцинома простате ($p>0,05$).



Графикон 5. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања ћелија карцинома простате DU145 након 48 сати раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије.

Тестирањем цитотоксичног ефекта комплекса паладијума *C1*, током раста у условима *in vitro* у трајању од 72 часа, јасно је показано да већ при моларној концентрацији комплекса од 3 μ М долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања које је износило 77,6 \pm 2,2%. При моларностима комплекса паладијума од 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М, такође је дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија ($p < 0,05$, графикон 6).

Након 72 часовне култивације *DU-145* ћелија, а у присуству испитиваних моларности паладијум комплекса *C2*, до сигнификантног умањења стопе преживљавања дошло је при моларности комплекса паладијума од 1 μ М, при чему је стопа преживљавања износила 67 \pm 5,1%. Такође, при испитиваним моларностима *C2* вишим од 1 μ М дошло је до статистички значајне промене стопе преживљавања малигних ћелија карцинома простате ($p < 0,05$, графикон 6).

Након тестирања комплекса паладијума *C3*, након 72 часовне култивације *DU-145* ћелија показано је да комплекс *C3* већ при моларности од 3 μ М доводи до сигнификантног умањења вијабилности *DU-145* ћелија, при чему стопа преживљавања износи 82 \pm 2,9%. Такође, испитиване вредности моларности *C3* од 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М доводе до статистички значајне промене стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија карцинома простате ($p < 0,05$, графикон 6).

Тестирани комплекс паладијума *C4* такође је након 72 часовне култивације *DU-145* ћелија показао снажан цитотоксични ефекат. Сигнификантно умањење стопе преживљавања испитиваних малигних ћелија је показано при моларности комплекса *C4* од 1 μ М, при чему је стопа преживљавања износила 78,5 \pm 4,3%. При моларностима комплекса *C4* већим од 1 μ М дошло је до сигнификантног умањења *DU-145* малигних ћелија ($p < 0,05$, графикон 6).

Као и сви претходно наведени комплекси, комплекс паладијума *C5* показао је снажан цитотоксични ефекат на ћелије карцинома простате. Резултати наше студије су показали да је до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигних ћелија дошло при вредности моларности *C5* од 3 μ М. Моларне концентрације *C5* веће од 3 μ М такође су узроковале сигнификантно умањење стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија ($p < 0,05$, графикон 6).

Истраживање је обухватило и испитивање цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 72 часа, при чему је јасно показано да при моларности цисплатине од 3 μ М долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигних ћелија, при чему вијабилност износи 78,5 \pm 3,1%. Такође, при моларностима вишим 3 μ М долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија ($p < 0,05$, графикон 6).

Испитивани лиганд обележен као *L1* након 72 часовне култивације *DU-145* ћелија показао је веома слаб цитотоксични ефекат на испитиваној малигној ћелијској линији. Стога, при испитиваним моларностима (0,3 μ М, 1 μ М, 3 μ М, 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М) лиганда *L1* није показана статистички значајна промена стопе преживљавања испитиваних туморских ћелија ($p > 0,05$).

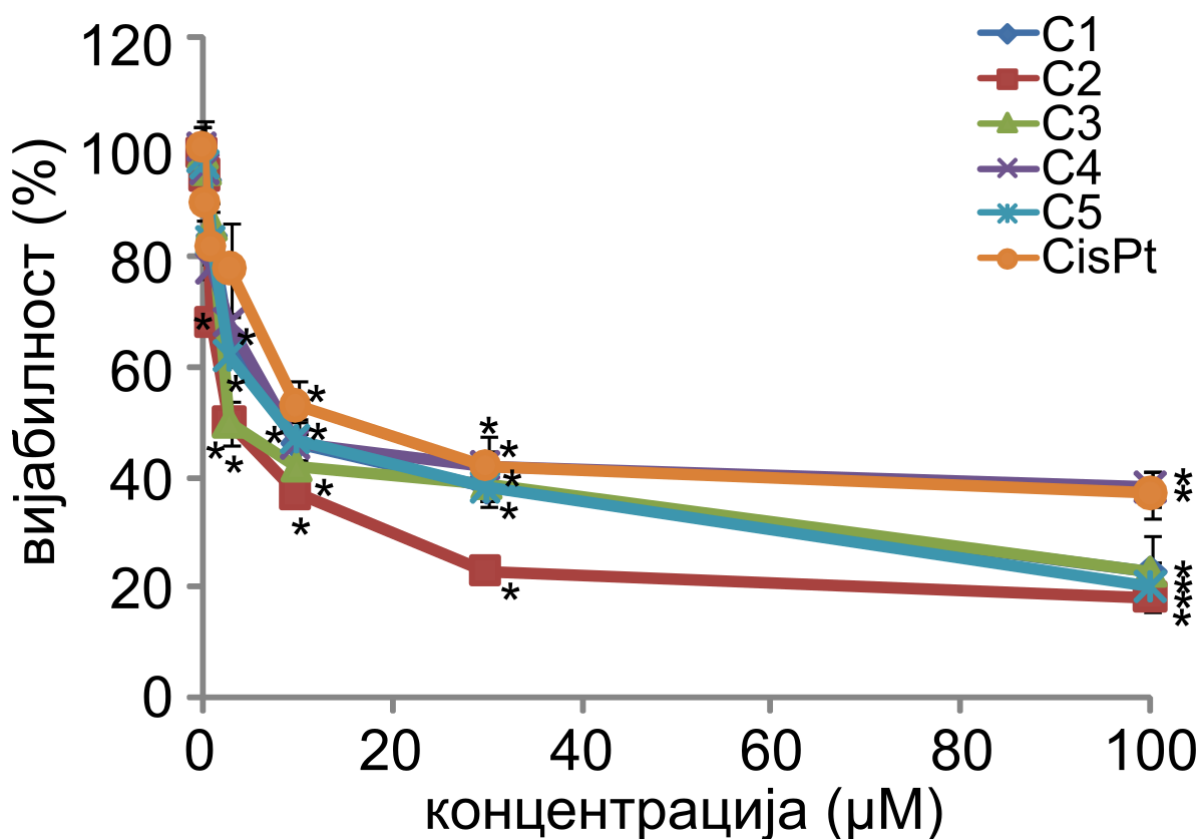
Такође, показано је да након 72 часовне култивације малигних ћелија и третирањем лигандом *L2* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних *DU-145* туморских ћелија ($p > 0,05$).

Приликом тестирања цитотоксичног ефекта лиганда *L3*, наши резултати су недвосмислено показали да поменути лиганд није узроковао сигнификантно умањење *DU-145* ћелија након 72 часовне култивације туморских ћелија ($p>0,05$).

При вредностима моларности лиганда *L4* од 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M, након 72 часа раста у условима *in vitro* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних *DU-145* малигних ћелија ($p>0,05$).

Након 72 часовне раста у условима *in vitro* *DU-145* малигних ћелија у присуству растућих вредности моларности лиганда *L5* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *DU-145* малигних ћелија ($p>0,05$). Стога, лиганд *L5* је показао изразито слаб цитотоксични ефекат на испитиване туморске ћелије.

Из претходно наведених резултата јасно и недвосмислено можемо доћи до закључка да су комплекси паладијума *C1-C5* показали снажан цитотоксични ефекат на ћелије карцинома простате *DU-145* у сва три испитивана временска интервала, што се може и видети из израчунатих IC_{50} вредности (табела 4). Као и код испитивања цитотоксичног ефекта на *PC-3* малигним ћелијама, и овде је такође показан фундаменталан значај присуства метала паладијума. Ово се објашњава веома slabим цитотоксичним ефектима лиганда на ћелије карцинома простате *DU-145*.



Графикон 6. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања ћелија карцинома простате DU145 након 72 сата раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије.

IC_{50} (µM)	DU-145		
	24h	48h	72h
C1	82.9±3.1	50.3±2.8	41.7±1.1
C2	98.7±2.7	47.8±5.2	26.2±3.7
C3	60.8±2.5	44.7±3.3	36.5±3.5
C4	134.9±4.1	59.1±2.1	47.6±2.2
C5	111.8±2.8	55.1±3.8	38.9±4.1
Cisplatin	134.5±1.5	57.2±2.2	49.2±4.7

Табела 4. IC_{50} вредности одговарајућих комплекса паладијума C1-C5 за тестиране DU-145 ћелије.

4.3. ЕФЕКАТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА, ОДГОВАРАЈУЋИХ ЛИГАНДА И ЦИСПЛАТИНЕ НА СТОПУ ПРЕЖИВЉАВАЊА ЋЕЛИЈА МАЛИГНО НЕИЗМЕЊЕНИХ ФИБРОБЛАСТА *MRC-5*

Након 24 часа раста у условима *in vitro* ћелија које су третиране растућим моларностима комплекса *C1*, није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања *MRC-5* малигно неизмењених фибробласта ($p>0,05$, графикон 7).

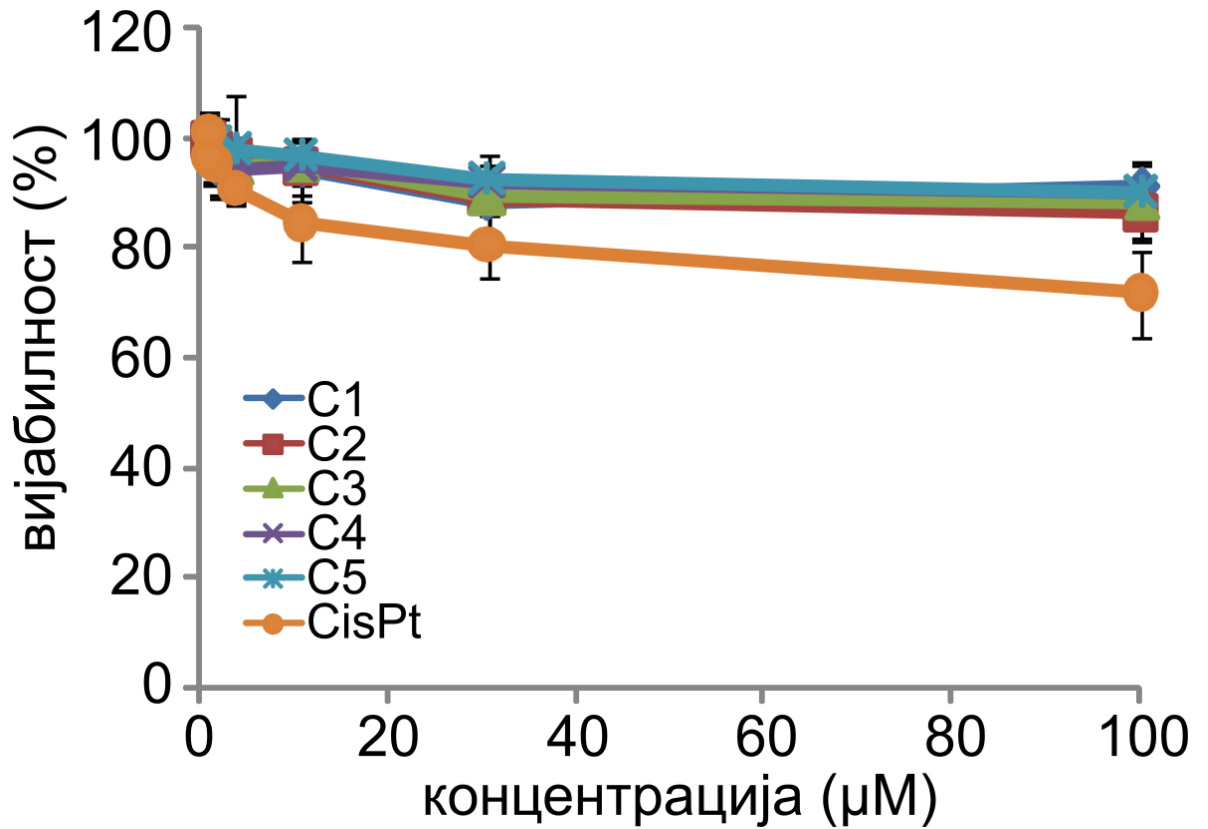
Комплекс паладијума *C2* је након 24 часа култивације ћелија показао веома слаб цитотоксични ефекат на малигно неизмењене фибробласте *MRC-5*. Прецизније, при испитиваним моларностима комплекса *C2* од 0,3 μ М, 1 μ М, 3 μ М, 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања ($p>0,05$, графикон 6).

При испитивању комплекса паладијума *C3* након 24 часа раста у условима *in vitro* није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених *MRC-5* ћелија у односу на контролу, нетретиране ћелије ($p>0,05$, графикон 7).

Такође, након испитивања цитотоксичног ефекта комплекса паладијума *C4* на *MRC-5* ћелије, након 24-часовне раста у условима *in vitro*, показано је да није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија ($p>0,05$, графикон 7).

Комплекс пладијума *C5*, као и претходно наведени комплекси након третмана и 24 часовне раста у условима *in vitro* *MRC-5* ћелија, није довео до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија ($p>0,05$, графикон 7).

За разлику од комплекса паладијума *C1-C5*, након третмана *MRC-5* ћелија моларном концентрацијом цисплатине од 100 μ М, дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија, при чему је стопа преживљавања износила $77\pm 4,4\%$ ($p<0,05$, графикон 7).



Графикон 7. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања малигно неизмењених фибробласта MRC5 након 24 сата раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије.

Након 48-часовног третмана *MRC-5* ћелија комплексом паладијума *C1*, до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија је дошло само при максималној моларности од 100 μ M ($p < 0,05$, графикон 8). При моларности од 100 μ M комплекса паладијума *C1*, стопа преживљавања *MRC-5* ћелија је износила 81,3 \pm 2,2%. Такође, при моларностима нижим од 100 μ M, није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија *MRC-5*.

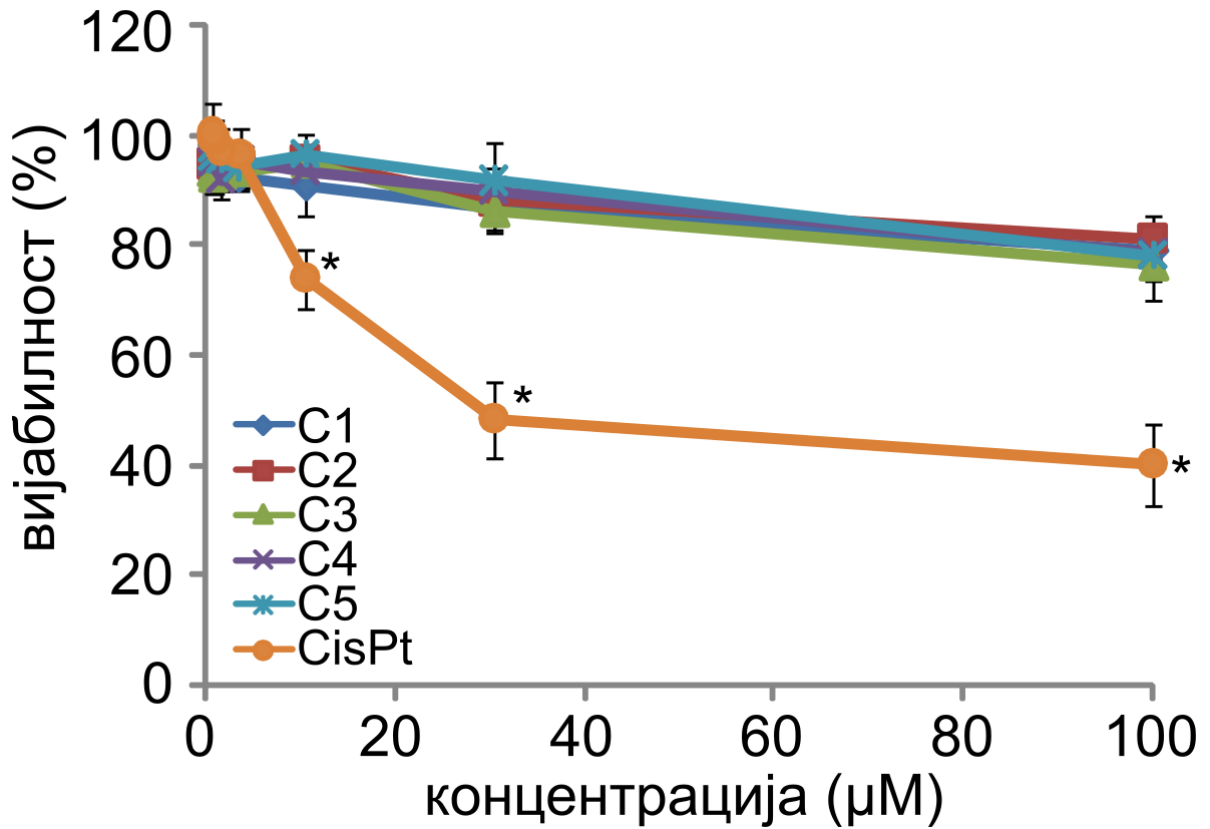
Након култивације *MRC-5* ћелија комплексом паладијума *C2*, у временском интервалу од 48 часова, при моларности од 100 μ M дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија ($p < 0,05$, графикон 8). Стопа преживљавања ћелија је износила 83,2 \pm 3,1%. Даље, при тестираним моларностима комплекса паладијума *C2* нижим од 100 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних *MRC-5* ћелија.

Истраживање је такође обухватило испитивање биолошке активности комплекса паладијума *C3* на малигно неизмењене фибробласте *MRC-5*. Након 48-часовне раста у условима *in vitro* комплекс *C3* је само при моларности од 100 μ M довео до сигнификантног умањења стопе преживљавања *MRC-5* ћелија ($p < 0,05$, графикон 8). Стопа преживљавања је износила 78,8 \pm 2,7%. При моларностима комплекса *C3* нижим од 100 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања тестираних фибробласта.

Наша студија је показала да комплекс паладијума *C4* доводи до сигнификантног пада стопе преживљавања *MRC-5* фибробласта након 48 часова раста у условима *in vitro*, при моларности од 100 μ M, при чему стопа преживљавања износи 80,6 \pm 1,5% ($p < 0,05$, графикон 8). При моларностима комплекса *C4* нижим од 100 μ M није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања малигно неизмењених фибробласта.

Као и претходно наведено комплекси паладијума, комплекс *C5* је довео до сигнификантног умањења стопе преживљавања испитиваних фибробласта само при максималној моларности од 100 μ M, при чему је вијабилност *MRC-5* ћелија износила 80,5 \pm 3,1% ($p < 0,05$, графикон 8).

Након 48 часова раста у условима *in vitro* односно третмана *MRC-5* ћелија цисплатином, до сигнификантног умањења стопе преживљавања фибробласта је дошло при концентрацији цисплатине од 10 μ M, 30 μ M и 100 μ M, при чему су вредности редом износиле 77 \pm 2,3%, 60 \pm 4,3%, 52 \pm 5,2% ($p < 0,05$, графикон 8). При моларној концентрацији цисплатине од 0,3 μ M, 1 μ M и 3 μ M није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених ћелија.



Графикон 8. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања малигно неизмењених фибробласта MRC5 након 48 сати раста у условима *in vitro*. * $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије

Након третмана малигно неизмењених *MRC-5* ћелија комплексом паладијума *C1* и 72 часа култивације, до сигнификантног умањења стопе преживљавања ћелија дошло је при моларности *C1* од 30 μ М, при чему је стопа преживљавања износила 81,1 \pm 2,4%. Такође, при моларности *C1* од 100 μ М, показано је сигнификантно умањење стопе преживљавања *MRC-5* ћелија, при чему је стопа преживљавања износила 72,2 \pm 3,1% ($p < 0,05$, графикон 9). Даље, при моларностима комплекса *C1* нижим од 30 μ М није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања испитиваних ћелија.

Испитван је цитотоксични ефекат комплекса паладијума *C2* на *MRC-5* ћелије, након 72 часа раста у условима *in vitro* до статистички значајног умањења стопе преживљавања фибробласта дошло је при вредностима моларности испитиваног комплекса *C2* од 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М ($p < 0,05$, графикон 9). Прецизније, стопа преживљавања малигно неизмењених ћелија је износила 86,4 \pm 3,4%, 84,5 \pm 2,5% и 79,2 \pm 4,4%. При нижим моларностима комплекса паладијума *C2* од 10 μ М није дошло до сигнификантног умањења *MRC-5* ћелија.

Тертман *MRC-5* ћелија комплексом паладијума *C3* након 72 часа раста у условима *in vitro* је довео до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених фибробласта при моларности од 3 μ М. Такође, до сигнификантног умањења стопе преживљавања *MRC-5* ћелија је дошло при моларностима *C3* комплекса од 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М ($p < 0,05$, графикон 9). При моларностима *C3* комплекса нижим од 3 μ М није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања фибробласта.

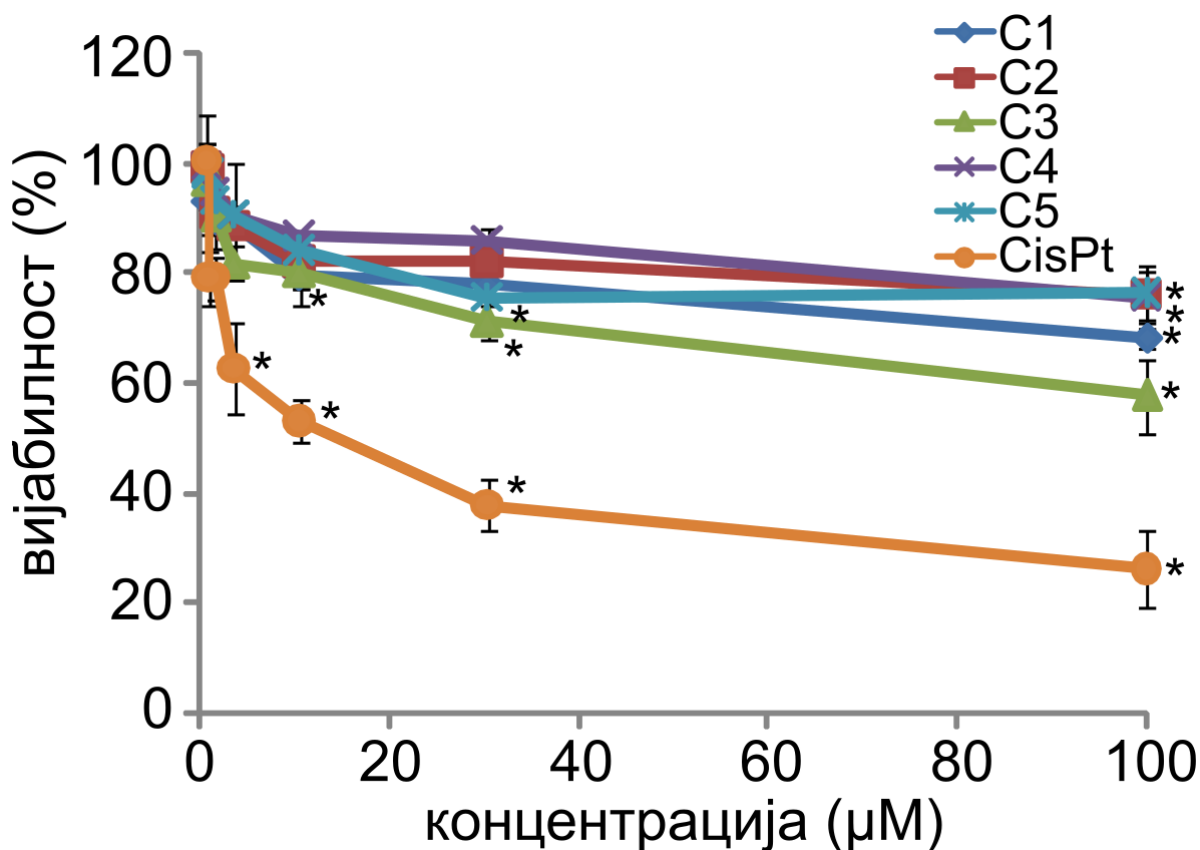
Такође, након 72-часовног третмана испитиваних малигно неизмењених ћелија комплексом паладијума *C4* у моларностима од 10 μ М, 30 μ М и 100 μ М дошло је до сигнификантног умањења стопе преживљавања *MRC-5* фибробласта, при чему су вредности износиле редом 88,6 \pm 2,7%, 87,9 \pm 3,9% и 78,6 \pm 1,3% ($p < 0,05$, графикон 9). При моларностима комплекса *C4* од 0,3 μ М и 1 μ М и 3 μ М није дошло до статистички значајне промене стопе преживљавања *MRC-5* фибробласта.

Паладијум комплекс *C5* је показао веома слаб цитотоксични ефекат након 72 часа раста у условима *in vitro* *MRC-5* ћелија. Прецизније, комплекс *C5* је при моларностима од 10 μ М 30 μ М и 100 μ М индуковао сигнификантно умањење малигно неизмењених фибробласта ($p < 0,05$, графикон 9). При томе је стопа преживљавања за претходно поменуте моларности комплекса *C5* износила редом 86,3 \pm 3,8%, 78,8 \pm 3,5% и 79,5 \pm 7,4%.

Наша студија је јасно показала да након 72-часовног третмана *MRC-5* ћелија цисплатином, при испитиваним моларностима од 1 μ М, 3 μ М, 10 μ М 30 μ М и 100 μ М долази до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених фибробласта ($p < 0,05$, графикон 9). Стопа преживљавања фибробласта је редом износила 82,1 \pm 3,4%, 67,2 \pm 7,4%, 58,6 \pm 3,5%, 45,1 \pm 4,1% и 34,6 \pm 2,8%.

Након третмана *MRC-5* ћелија растућим моларностима лиганада *L1-L5*, јасно је утврђено да није дошло до сигнификантног умањења стопе преживљавања малигно неизмењених фибробласта у сва три испитивана временска интервала ($p > 0,05$).

Из претходно јасно дефинисаних резултата наше студије можемо недвосмислено закључити да испитивани комплекси паладијума *C1-C5* показују веома слаб цитотоксични ефекат на малигно неизмењене фибробласте, док је цисплатина показала умерен цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелијској линији. Такође, све ово можемо констатовати и на основу израчунатих *IC*₅₀ вредности (табела 5).



Графикон 9. Утицај растућих моларности (до 100µM) новосинтетисаних комплекса паладијума(II) C1-C5 и цисплатине (CisPt) на стопу преживљавања малигно неизмењених ћелија, фибробласта MRC5 након 72 сата раста у условима *in vitro*.
* $p < 0,05$ у односу на нетретиране ћелије.

IC_{50} (µM)	MRC-5		
	24h	48h	72h
C1	>200	>200	182.13±23.15
C2	>200	>200	196.24±12.7
C3	>200	>200	152.41±14.92
C4	>200	>200	>200
C5	>200	>200	>200
Cisplatin	198.28±12.98	116.74±7.41	20.7±2.03

Табела 5. IC_{50} вредности одговарајућих комплекса паладијума C1-C5 за тестиране MRC-5 ћелије.

5. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ ПРОЦЕС АПОПТОЗЕ МАЛИГНИХ ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ

На основу добијених резултата МТТ теста, наше истраживање је јасно показало да синтетисани *Pd(II)* комплекси (*C1-C5*) испољавају снажан цитотоксичан ефекат на туморске ћелијске линије, као и да имају висок степен селективности према малигну неизмењеним ћелијама (фибробласти). На основу свега наведеног, следећи циљ наше студије се односио на испитивање којим типом ћелијске смрти долази до смањења стопе преживљавања туморских ћелија које су третиране комплексима паладијума. Малигну измењене ћелије су третиране моларном концентрацијом паладијум комплекса која смањује стопу преживљавања ћелија карцинома простате за 50% (IC_{50}), након 24 часа третмана. Затим је на малигнуј ћелијској популацији урађена детаљна анализа, који тип ћелијске смрти је доминантан и индукован од стране паладијум комплекса, а у циљу добијања резултата користили смо *Annexin V/7AAD* методу.

5.1. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ АПОПТОЗУ ЋЕЛИЈА АДЕНОКАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ *PC-3*

Малигне ћелије аденокарцинома простате *PC-3* су третиране IC_{50} вредностима комплекса паладијума *C1-C5*, а затим су након 24 часа раста у условима *in vitro* бојене методом *Annexin V-FITC*-ом и *7AAD*-ом. Контролну популацију ћелија су заправо чиниле нетретиране малигне *PC-3* ћелије. Процент малигнух ћелија које су апопточине испитиван је *FACS* анализом.

Код малигнух *PC-3* ћелија које нисмо третирали комплексима паладијума (контролна популација) након 24 часа раста у условима *in vitro* чак 98,1% ћелија од укупне популације је било вијабилно. Око 1% *PC-3* ћелија је било у стадијуму ране и касне апоптозе и 1% малигнух ћелија је било у стадијуму некрозе. С обзиром на чињеницу да се ради о контролној популацији *PC-3* ћелија које нису третиране *Pd(II)* комплексима, било је очекивано да је највећи проценат малигнух ћелија карцинома простате вијабилно.

Наша студија је јасно показала да применом комплекса паладијума *C1*, осим што што се смањује стопа преживљавања малигнух ћелија, такође се иницира процес апоптозе *PC-3* испитиваних малигнух ћелија. Комплекс паладијума *C1* при моларности од 21,84 μ М је смањио стопу преживљавања *PC-3* малигнух ћелија на 52,4%, при чему је било 47,6% туморских ћелија код којих је индукован процес апоптозе, док је само незнатни проценат малигнух ћелија било некротично. Прецизније, 29,9% *PC-3* малигнух ћелија је било у фази ране апоптозе, док је 17,4% туморских ћелија било у стадијуму касне апоптозе (графикон 10).

Третманом *PC-3* малигнух ћелија моларном концентрацијом комплекса паладијума *C2* од 28,9 μ М након 24 часа раста у условима *in vitro* проценат вијабилних ћелија је износио 45,1%, док је проценат апоптотичних малигнух ћелија износио 54,6%. Такође, само незнатни проценат малигнух ћелија је био некротичан. Од укупног броја туморских ћелија 44,8% је детектовано у стадијуму ране апоптозе, док је 9,8% *PC-3* малигнух ћелија било у стадијуму касне апоптозе (графикон 10).

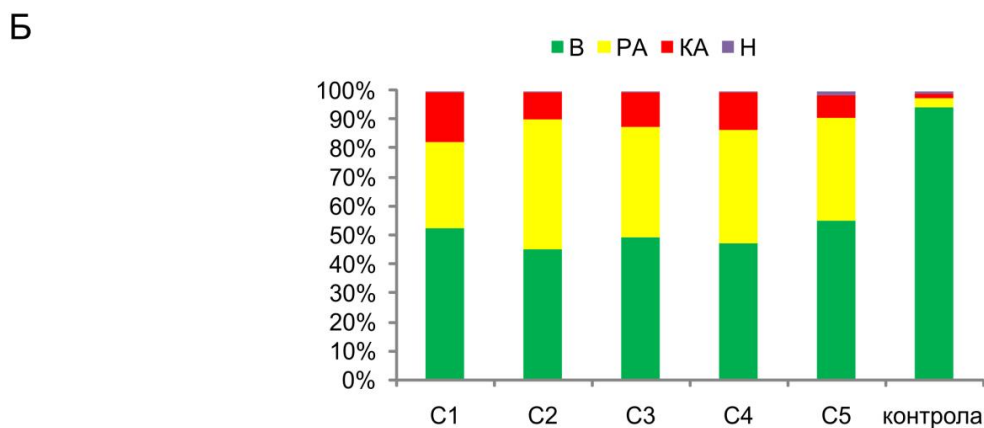
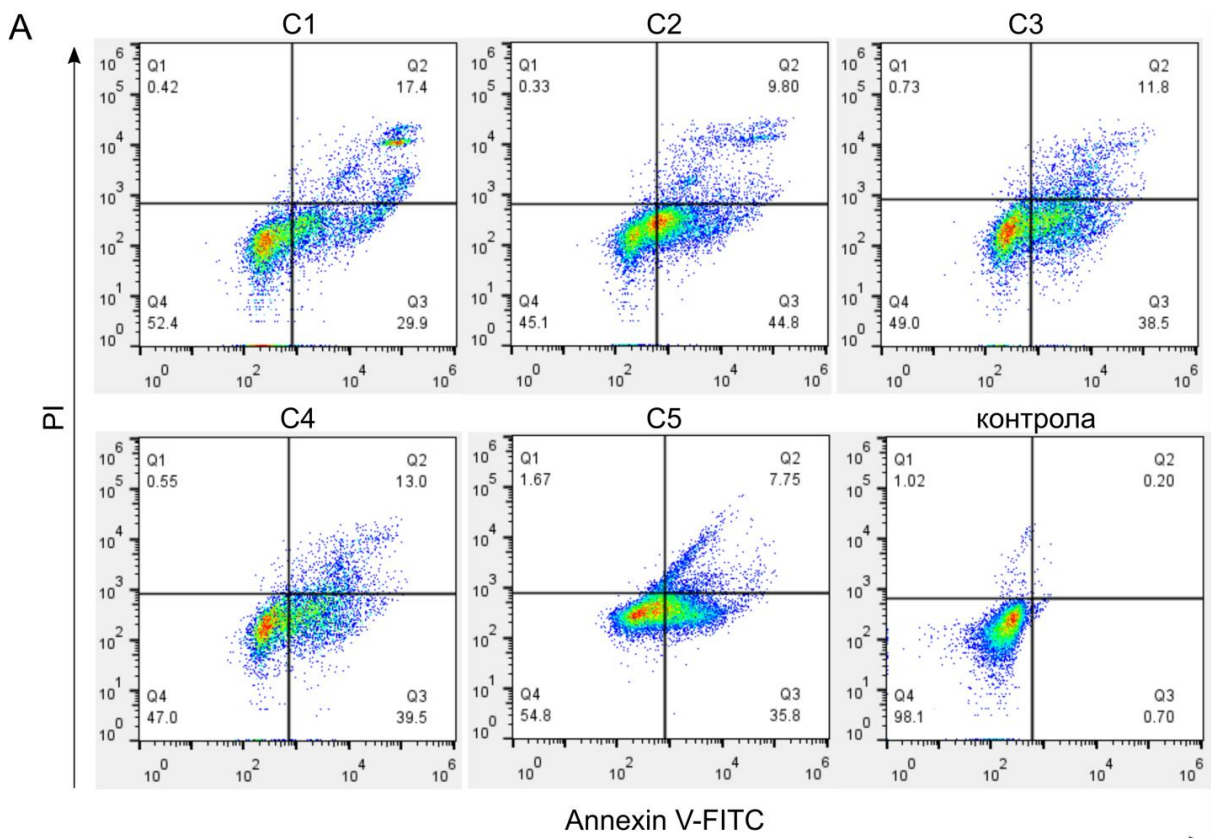
Применом комплекса паладијума *C3* у испитиваној моларности од 90,74 μ М након 24 часа раста у условима *in vitro* *PC-3* малигнух ћелија, дошло је до смањења стопе преживљавања туморских ћелија, при чему је проценат вијабилних ћелија износио 49%. Затим, 50,3% *PC-3* малигнух ћелија је било апоптотично, при чему је проценат ћелија у раној апоптози износио 38,5%, док је проценат ћелија у касној апоптози износио 11,8%.

Незнатни проценат *PC-3* малигнух ћелија је детектован у стадијуму некрозе (графикон 10).

Након третмана *PC-3* малигнух ћелија *Pd(II)* комплексом *C4* у моларности од 43,2 μ М, након 24 часа раста у условима *in vitro*, проценат вијабилних туморских ћелија је износио 47%, док је проценат малигнух ћелија у апоптози износио 52,5%. Прецизније, проценат *PC-3* малигнух ћелија у раној апоптози је износио 39,5% док је проценат туморских ћелија у фази касне апоптозе износио 13%. Само 0,5% ћелија је детектовано у фази некрозе (графикон 10).

Паладијум комплекс *C5*, такође индукује процес апоптозе *PC-3* малигнух ћелија карцинома простате. Након третмана комплексом *C5* у моларности од 43,3 μ М, детектовано је 54,8% вијабилних *PC-3* малигнух ћелија, док је и стадијуму апоптозе уочено 43,6% ћелија. Од укупног броја *PC-3* малигнух ћелија 35,8% је било у фази ране апоптозе, док је 7,8% туморских ћелија детектовано у фази касне апоптозе. Само 1% малигнух некротичних ћелија је уочено (графикон 10).

Из претходно наведених резултата можемо јасно закључити да комплекси паладијума *C1-C5* сигнификантно смањују стопу преживљавања *PC-3* туморских ћелија индукцијом процеса програмиране ћелијске смрти, ране апоптозе.



Графикон 10. Релативни однос вијабилних (В), ћелија у раној апоптози (РА), ћелија у касној апоптози (КА) и некротичних ћелија (Н) након 24-часовног третмана *PC-3* ћелија IC_{50} вредностима комплекса паладијума (II) C1-C5. А. Репрезентативни дијаграми добијени проточном цитометријом након двоструког бојења *Annexin*-ом *V-FITC* и пропидијум-јодидом (*PI*). Б. Просечан проценат вијабилних (В), ћелија у раној апоптози (РА), ћелија у касној апоптози (КА) и некротичних ћелија (Н). Контролну групу ћелија представљају нетретирание *PC-3* ћелије.

5.2. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ АПОПТОЗУ ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ *DU-145*

Код туморских *DU-145* ћелија које нису тертиране комплексима паладијума (контролна популација) након 24 часа раста у условима *in vitro* око 96% испитиваних ћелија је било вијабилно. Прецизније, око 3,5% ћелија је детектовано у стадијуму ране и касне апоптозе, односно 1,73% ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, а само 1,73% ћелија је детектовано у стадијуму касне апоптозе (графикон 11).

Комплекс паладијума *C1* је при моларности од 82,9 μ M (IC_{50} вредност након 24 часа раста у условима *in vitro*) смањило стопу преживљавања малигних *DU-145* ћелија, при чему је било око 30% ћелија у стадијуму апоптозе, од чега је 24% ћелија било у фази ране апоптозе, а око 6% ћелија је било у фази касне апоптозе. Око 70% од укупне популације испитиваних малигних *DU-145* ћелија је било вијабилно, а само незнатни проценат ћелија се налазио у стадијуму некрозе (графикон 11).

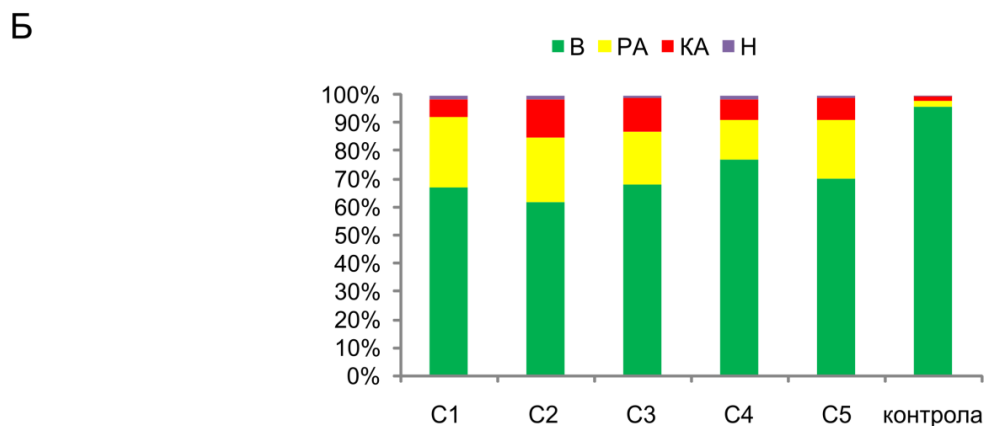
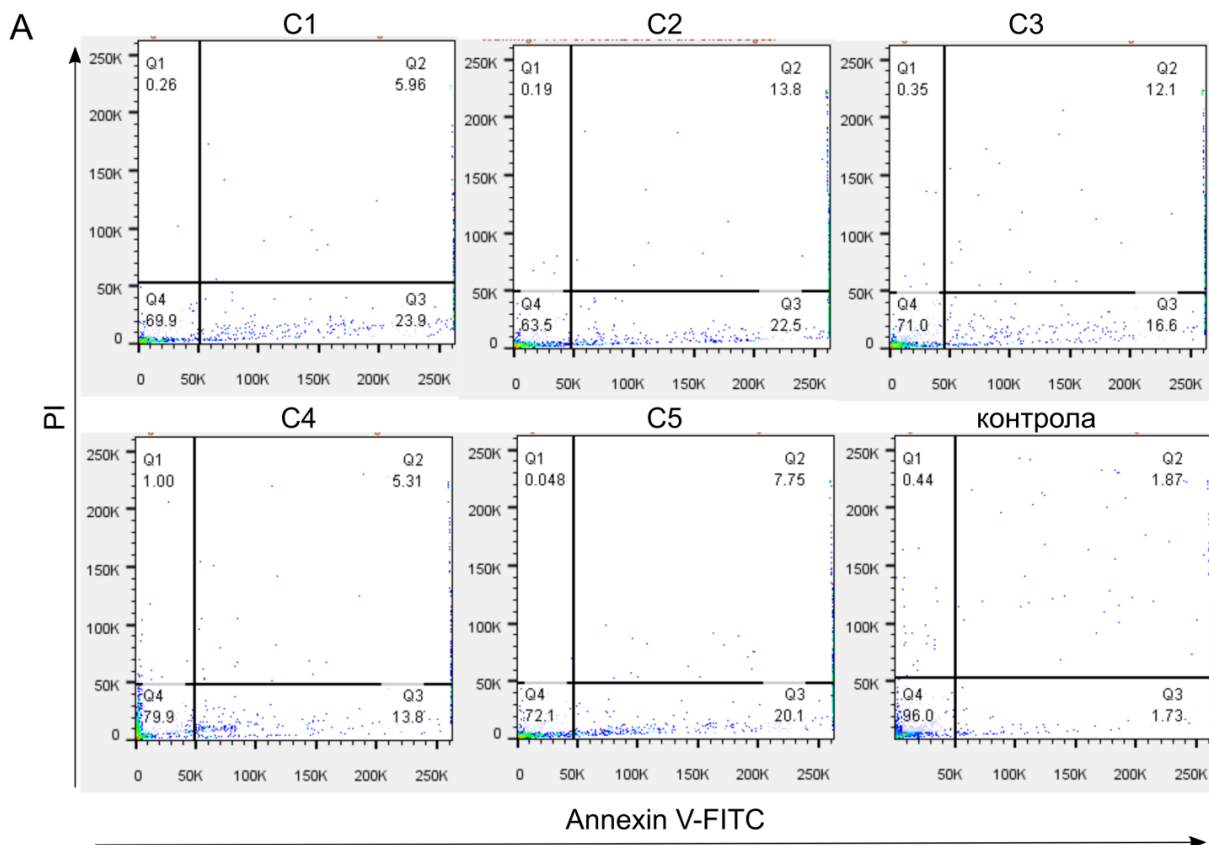
Након примене комплекса *C2* при моларности од 98,7 μ M (IC_{50} вредност након 24 часа раста у условима *in vitro*), дошло је до смањења стопе преживљавања туморских ћелија карцинома простате *DU-145*. Од укупне популације тертираних туморских ћелија 22,5% је било у фази ране апоптозе, а око 13,8% ћелија се налазило у фази касне апоптозе. Такође, око 63,5% *DU-145* ћелија је било вијабилно, а само незнатни проценат испитиваних ћелија се налазио у стадијуму некрозе (графикон 11).

Применом комплекса паладијума *C3* при моларности од 60,8 μ M, дошло је до сигнификантног смањења стопе преживљавања испитиваних *DU-145* туморских ћелија. Прецизније, 16,6% испитиваних ћелија се налазило у стадијуму ране апоптозе, док је 12,1% испитиваних *DU-145* ћелија било у фази касне апоптозе. Од укупног броја испитиваних ћелија око 71% је било вијабилних ћелија, док је око 0,4% туморских ћелија се налазило у фази некрозе (графикон 11).

Након третмана *DU-145* туморских ћелија комплексом *C4* моларном концентрацијом од 134,9 μ M, око 80% ћелија је било вијабилно, док је око 20% ћелија детектовано у стадијуму апоптозе. Прецизније, 13,8% испитиваних *DU-145* ћелија је детектовано у стадијуму ране апоптозе, док је 5,3% ћелија се налазило у фази касне апоптозе (графикон 11).

Тертирањем *DU-145* ћелија комплексом паладијума *C5* при моларности од 111,8 μ M, је детектовано 72,1% испитиваних ћелија које су биле вијабилне. Такође, око 20,1% испитиваних ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, док је 7,7% ћелија детектовано у стадијуму касне апоптозе (графикон 11).

Резултати наше студије недвосмислено показују да су сви испитивани *Pd(II)* комплекси индуковали процес апоптозе малигних *DU-145* ћелија.



Графикон 11. Релативни однос вијабилних (**В**), ћелија у раној апоптози (**РА**), ћелија у касној апоптози (**КА**) и некротичних ћелија (**Н**) након 24-часовног третмана *DUI45* ћелија IC_{50} вредностима комплекса паладијума (II) **C1-C5**. **А.** Репрезентативни дијаграми добијени проточном цитометријом након двоструког бојења *Annexin*-ом *V-FITC* и пропијидијум-јодидом (*PI*). **Б.** Просечан проценат вијабилних (**В**), ћелија у раној апоптози (**РА**), ћелија у касној апоптози (**КА**) и некротичних ћелија (**Н**). Контролну групу ћелија представљају нетретиране *DUI45* ћелије.

6. КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА УТИЧУ НА ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС ИСПИТИВАНИХ ТУМОРСКИХ ЋЕЛИЈА

Смањење стопе преживљавања малигних ћелија одређеним потенцијалним хемиотерапеутицима може се постићи активацијом процеса програмиране ћелијске смрти (апоптоза), или индукцијом застоја у различитим фазама ћелијског циклуса. Такође, смањење стопе преживљавања туморских ћелија може да настане услед комбинације оба претходно наведена механизма. Наша студија је јасно показала да испитивани *Pd(II)* комплекси смањују стопу преживљавања *PC-3* и *DU-145* малигних ћелија индукцијом процеса апоптозе. Стога, наредни корак у нашој студији је био да се истражи да ли комплекси паладијума смањују стопу преживљавања туморских ћелија и индукцијом застоја у ћелијском циклусу. Контролну популацију испитиваних малигних ћелија чине ћелије које нису третиране комплексима паладијума. Испитиване *PC-3* и *DU-145* туморске ћелије су третиране комплексима *C1-C5*, односно одговарајућим *IC₅₀* вредностима након 24 часа раста у условима *in vitro*. Студија је обухватила анализу процента испитиваних малигних ћелија које се налазе у *G0/G1*, *S* и *G2/M* фази, методом бојења пропидијум јодидом, при чему је експеримент рађен у трипликату.

6.1. ЕФЕКАТ ИСПИТИВАНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА НА ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС *PC-3* ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ

Када говоримо о контролној популацији *PC-3* ћелија, која није третирана комплексима паладијума, након 24 часа раста у условима *in vitro* се око 56,6% испитиваних ћелија налазило у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, док се у *S*-фази ћелијског циклуса налазило 36,2% ћелија, а 7,2% туморских ћелија се налазило у *G2/M* фази ћелијског циклуса (графикон 12).

Након тертмана комплексом паладијума *C1* при моларности од 28,4 μ M (*IC₅₀* вредност након 24 часа раста у условима *in vitro*) око 59,6 % испитиваних ћелија се налазило у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Даље, у *S*-фази ћелијског циклуса се налазило 31,1% испитиваних малигних ћелија док је 9,3% ћелија детектовано у *G2/M* фази ћелијског циклуса. Стога, можемо јасно закључити да након тертмана комплексом *C1* на *PC-3* ћелије, није дошло до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на контролне нетретиране ћелије (графикон 12).

Комплекс паладијума *C2* при моларности од 28,9 μ M је након 24 часа раста у условима *in vitro* индуковао застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса код *PC-3* ћелија карцинома простате. Процент испитиваних малигних ћелија које су биле у *G0/G1* фази је износио 34,8%, док је 45,3% ћелија детектовано у *S*-фази ћелијског циклуса, а 19,9% ћелија се налазило у *G2/M* фази ћелијског циклуса. Прецизније, дошло је до сигнификантног повећања процента испитиваних малигних ћелија које су детектоване у *G2/M* фази у односу на контролне нетретиране ћелије (графикон 12).

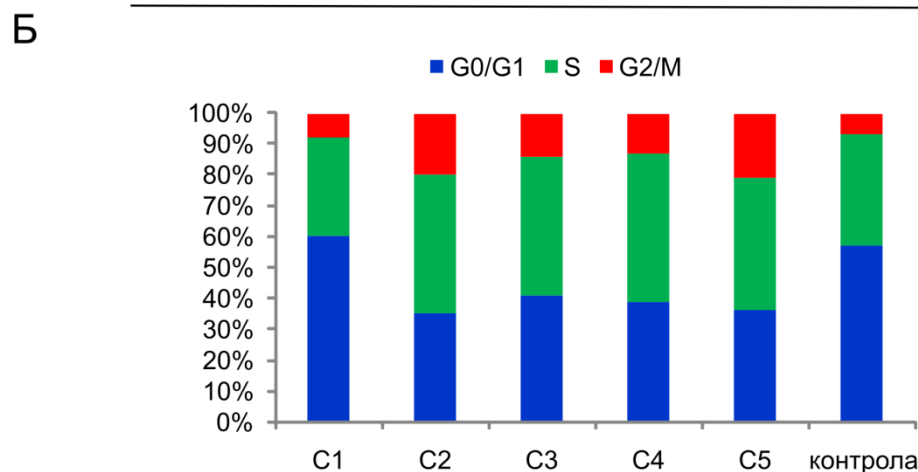
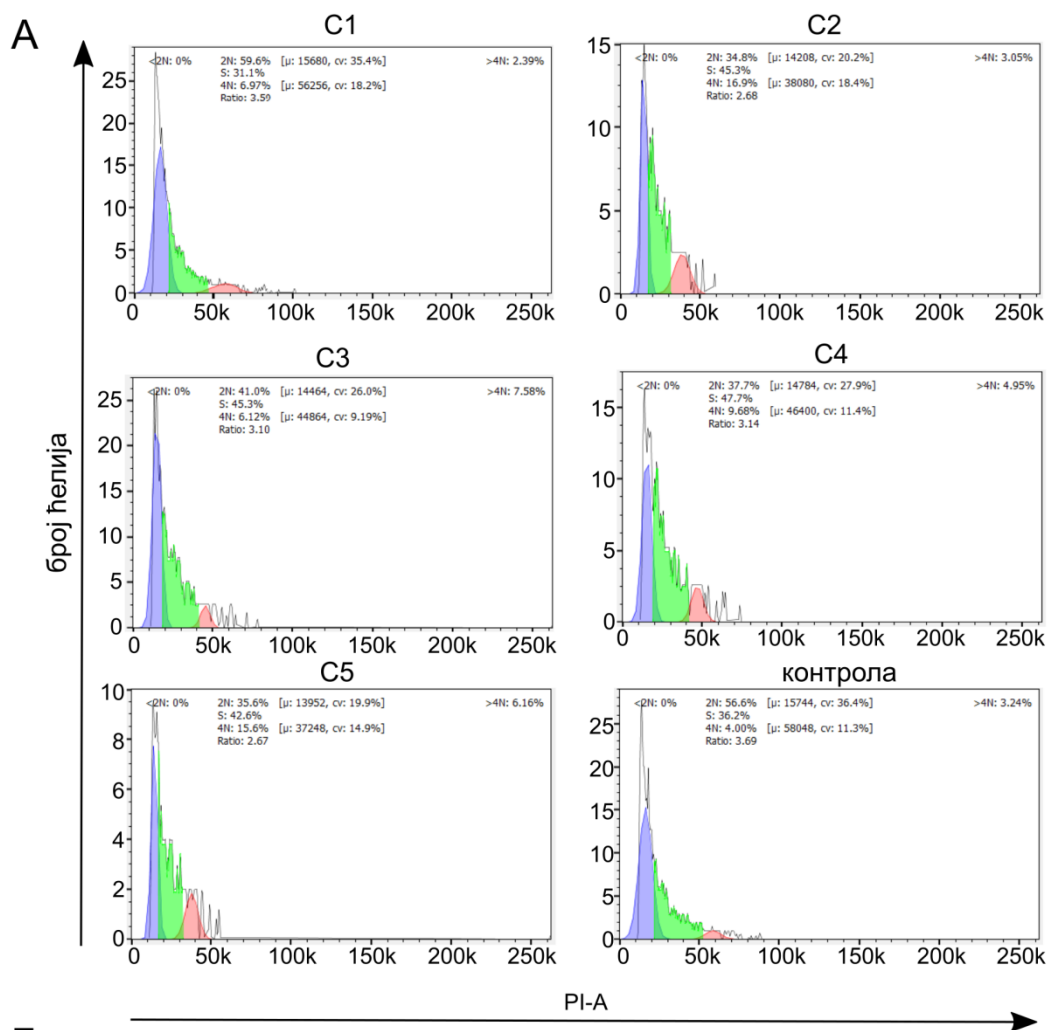
Применом комплекса паладијума *C3* при моларности од 90,7 μ M након 24 часа раста у условима *in vitro* дошло је до повећане детекције *PC-3* ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса. Прецизније, дошло је до сигнификантног повећања процента испитиваних *PC-3* ћелија које су се налазиле у *G2/M* фази у односу на контролне ћелије које нису третиране комплексом *C3*. Процент *PC-3* ћелија у *G0/G1* фази је износио 41%, док је 45,3% испитиваних ћелија детектовано у *S*-фази ћелијског циклуса, а 13,7% ћелија се налазило у *G2/M* фази ћелијског циклуса (графикон 12).

Након ефекта комплекса паладијума *C4* на *PC-3* малигне ћелије при моларности од 43,2 μ M, дошло је до акумулације испитиваних туморских ћелија у *G2/M* фази

ћелијског циклуса. Процент *PC-3* ћелија у *G0/G1* фази је износио 37,7%, у *S*-фази ћелијског циклуса детектовано је 47,7% ћелија, док је проценат испитиваних малигних ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса износио 14,6% (графикон 12).

Након тертмана *PC-3* малигних ћелија комплексом паладијума *C5* при моларности од 43,3 μ M, након 24 часа раста у условима *in vitro*, дошло је до сигнификантног увећања процента *PC-3* малигних ћелија које су се налазиле у *G2/M* фази ћелијског циклуса. Прецизније, проценат *PC-3* ћелија у *G0/G1* фази је износио 35,6%, у *S*-фази ћелијског циклуса је износио 42,6%, а у *G2/M* фази ћелијског циклуса је износио 14,6% (графикон 12).

Резултати наше студије су јасно показали да комплекси паладијума *C2-C5* осим што индукују процес апоптозе, такође смањују стопу преживљавања испитиваних *PC-3* ћелија индукцијом застоја у *G2/M* фази ћелијског циклуса.



Графикон 12. Паладијум(II) комплекси (C2-C5) изазивају застој у G2/M фази ћелијског циклуса туморских ћелија PC-3. **A.** Репрезентативни дијаграми добијени проточном цитометријом PC-3 ћелија обојених пропијидијум-јодидом (PI). **B.** Просечан проценат ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса (плаво), S-фази ћелијског циклуса (зелено) и G2/M фази ћелијског циклуса (црвено). Контролну групу представљају нетретиране PC-3 ћелије.

6.2.ЕФЕКАТ ИСПИТИВАНИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА НА ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС *DU-145* ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА ПРОСТАТЕ

Када говоримо о контролној, нетретираној популацији *DU-145* ћелија важно је напоменути да након 24 часа раста у условима *in vitro* 29,7% испитиваних ћелија се налазило у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, 31,8% туморских ћелија је детектовано у *S*-фази, а 38,5% ћелија се налазило у *G2/M* фази ћелијског циклуса (графикон 13).

Након примене комплекса паладијума *C1* при моларности од 82,9 μ M, после 24 часа раста у условима *in vitro*, дошло је до застоја испитиваних *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Прецизније, у *G0/G1* фази ћелијског циклуса проценат испитиваних ћелија је износио 49,1%, у *S*-фази их је било 25,6%, док је у *G2/M* фази ћелијског циклуса проценат износио 25,3%. Можемо јасно закључити да је дошло до сигнификантног повећања процента ћелија које су детектоване у *G0/G1* фази ћелијског циклуса у односу на контролу (графикон 13).

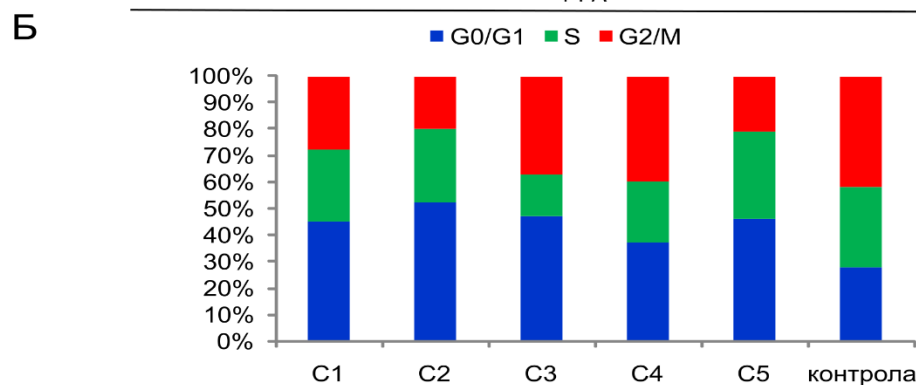
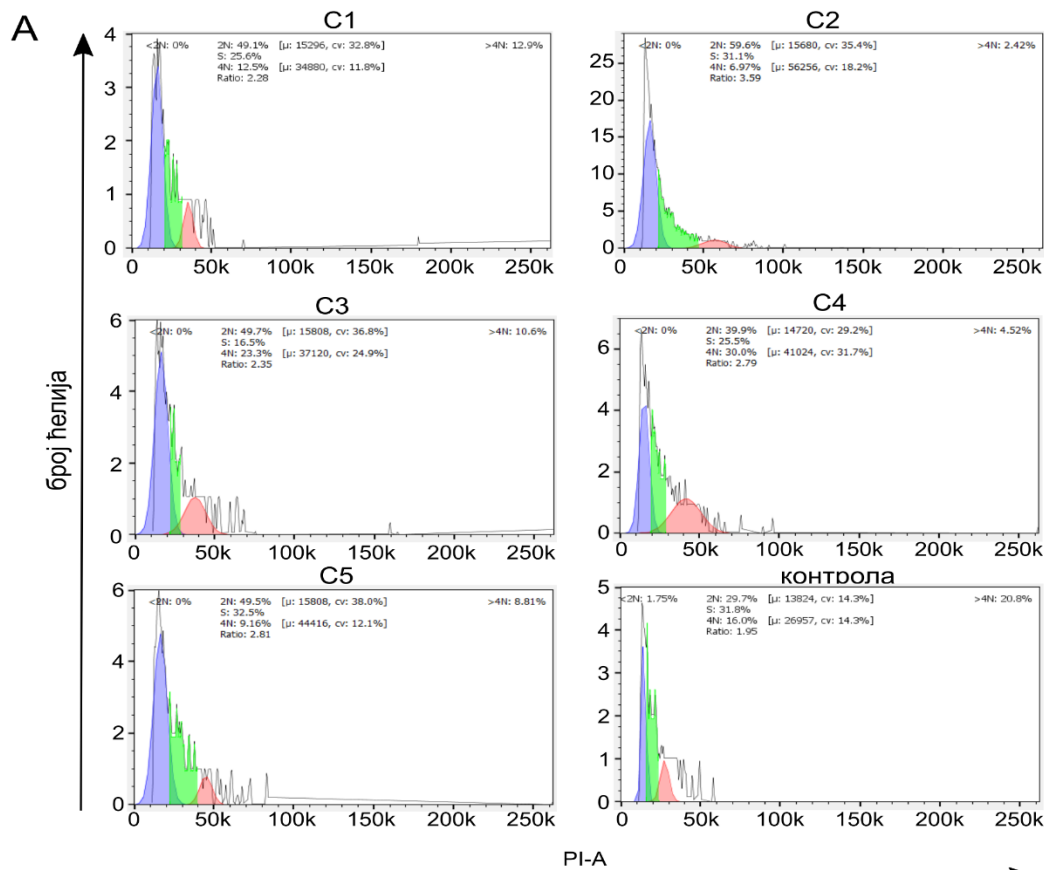
Применом комплекса паладијума *C2* при моларности од 98,7 μ M, после 24 часа раста у условима *in vitro*, дошло је до застоја у *S*-фази ћелијског циклуса испитиваних малигних ћелија. Прецизније, дошло је до сигнификантног повећања процента *DU-145* ћелија у *S*-фази ћелијског циклуса у односу на контролу. Тачан проценат *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса је износио 32,8%, у *S* фази 45,3%, док је у *G2/M* фази проценат испитиваних ћелија износио 19,9% (графикон 13).

Наша студија је показала да применом комплекса паладијума *C3* у моларној концентрацији од 60,8 μ M, након 24 часа раста у условима *in vitro*, је дошло до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Прецизније, дошло је до сигнификантног повећања процента испитиваних *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Стога, проценат *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса је износио 49,7%, у *S* фази 16,5% док је у *G2/M* фази проценат износио 33,8% (графикон 13).

Након третмана *DU-145* ћелија комплексом *C4*, при моларности која је износила 134,9%, након 24 часа раста у условима *in vitro* дошло је до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Стога, јасно је да се највећи проценат испитиваних *DU-145* малигних ћелија налазио управо у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Процент детектованих туморских *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса је износио 39,9%, у *S* фази 25,5%, док је у *G2/M* фази тај проценат износио 34,6% (графикон 13).

Даље, комплекс паладијума обележен као *C5* је након третмана и 24 часа раста у условима *in vitro* индуковао застој у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Стога, јасно је да је статистички значајан пораст процента испитиваних малигних *DU-145* ћелија детектован у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Прецизније проценат *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса је износио 49,5%, у *S*-фази 32,5% док је у *G2/M* фази тај проценат износио 18% (графикон 13).

Из претходно наведених резултата наше студије можемо јасно и недвосмислено закључити да су комплекси паладијума *C1*, *C3*, *C4* као и *C5* индуковали застој малигних *DU-145* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, док је комплекс *C2* индуковао застој у *S*-фази ћелијског циклуса (графикон 13).



Графикон 13. Паладијум(II) комплекси (C2-C5) изазивају застој ћелијског циклуса туморских ћелија *DUI45*. **А.** Репрезентативни дијаграми добијени проточном цитометријом *DUI45* ћелија обојених пропидијум-јодидом (PI). **Б.** Просечан проценат ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса (плаво), S-фази ћелијског циклуса (зелено) и G2/M фази ћелијског циклуса (црвено). Контролну групу представљају нетретиране *DUI45* ћелије.

7. ИСПИТИВАНИ КОМПЛЕКСИ ПАЛАДИЈУМА ИНДУКУЈУ ПРОЦЕС ПРОГРАМИРАНЕ ЋЕЛИЈСКЕ СМРТИ АКТИВАЦИЈОМ УНУТРАШЊЕГ МИТОХОНДРИЈАЛНОГ ПУТА

Процес апоптозе се индукује преко два есенцијална сигнална пута, спољашњи пут и митохондријални (унутрашњи) пут. Да би се у ћелији активирао процес апоптозе индукцијом спољашњег пута неопходна је активација „рецептора смрти“ (енг. *death receptor*) као и присуство каспазе-8 (98).

Уколико дође до активације унутрашњег митохондријалног пута, доћи ће до промене у моларностима регулаторних и кључних проапоптотичних протеина и антиапоптотичних протеина. Прецизније, кључна промена када говоримо о активацији митохондријалног пута апоптозе се огледа у порасту концентрације *Bax* проапоптотичног протеина као и смањењу концентрације антиапоптотичних *Bcl-2* протеина. Све ово за последицу има транслокацију *Bax* протеина из цитоплазме у спољашњу митохондријалну мембрану, при чему митохондријална мембрана постаје пропустљива и долази до ослобађања цитохрома *c*. Након ослобађања цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму, долази до активације каспаза-9 и 3. Активација процеса апоптозе митохондријалним путем је управо индуквана од стране активних каспаза-9 и 3 (98).

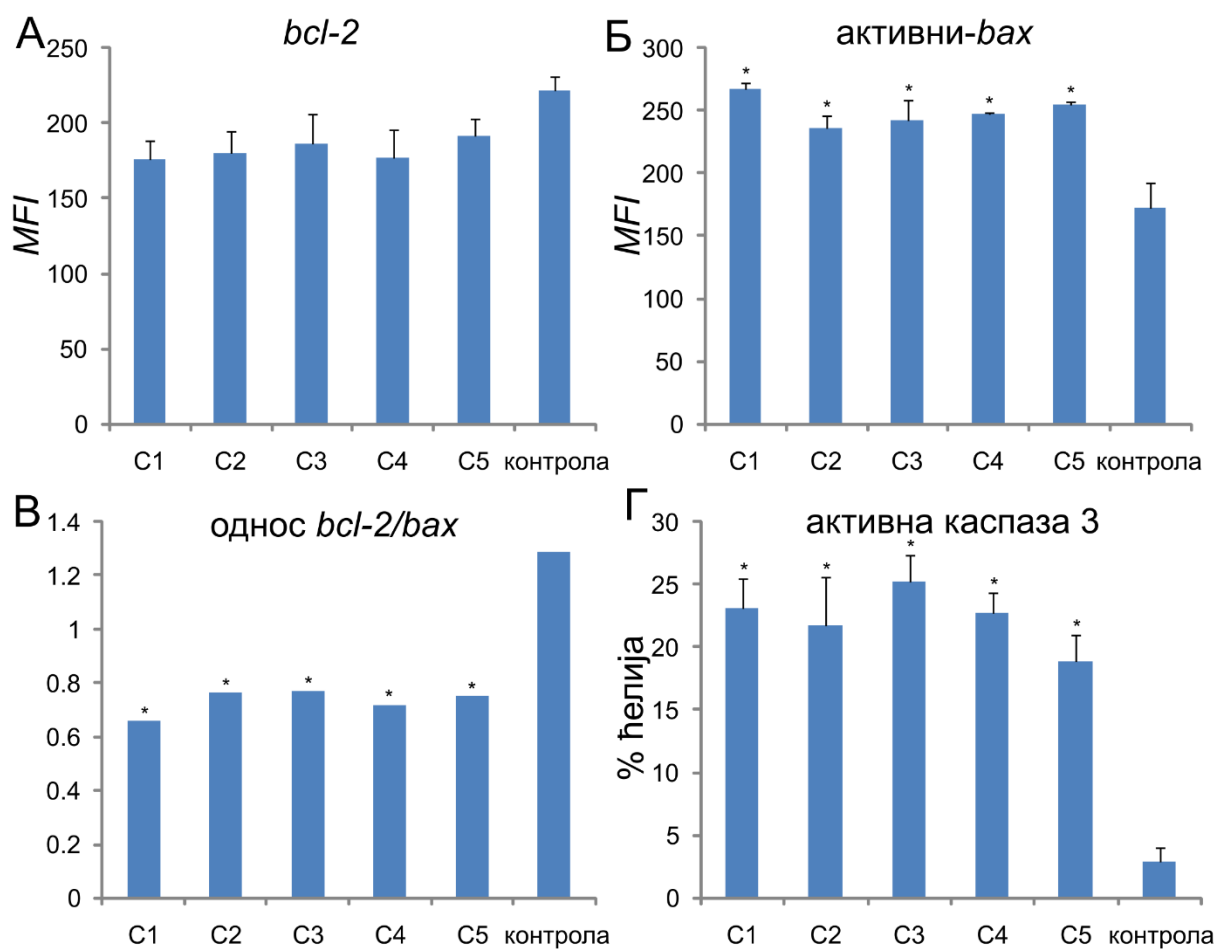
Наша студија је обухватила испитивање ефекта комплекса паладијума *C1-C5*, након 24 часа раста у условима *in vitro* *PC-3* и *DU-145* малигнућ ћелија, на концентрацију и активацију протеина *Bax*, *Bcl-2* и каспазе-3. У циљу проучавања механизма апоптозе, обележавали смо *PC-3* и *DU-145* малигнућ ћелија примарним и секундарним антителима за протеине *Bax*, *Bcl-2* и каспазу-3. Мерењем просечног интензитета флуоресценције (енг. *MFI - mean fluorescence intensity*) одређивана је концентрација и активација испитиваних протеина апоптозе, такође одређиван је проценат испитиваних малигнућ ћелија које емитују флуоресценцију коришћењем проточне цитометрије.

Добијени резултати у нашем истраживању јасно указују да испитивани комплекси паладијума *C1-C5* индукују унутрашњи митохондријални апоптотични пут код малигнућ трансформисаних *PC-3* ћелија. Прецизније, комплекси паладијума обележени као *C1*, *C2*, *C3*, *C4* и *C5* индукују сигнификантно повећање просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) *Bax* протеина, који има кључну улогу у активацији унутрашњег пута, у поређењу са контролном популацијом малигнућ ћелија коју чине нетретиране *PC-3* ћелије (графикон 14). Код *PC-3* ћелијске популације која није третирана одговарајућим комплексима паладијума (контрола), просечан интензитет флуоресценције за испитивани активни *Bax* протеин је износио 172. За разлику од контролне нетретиране популације *PC-3* ћелија, код испитиваних малигнућ ћелија које су третиране комплексима паладијума *C1-C5* просечан интензитет флуоресценције је износио редом: 267,3, 236,3, 242,5, 247,4, и 255,1. Можемо јасно закључити да је код туморских ћелија које су третиране одговарајућим комплексима паладијума показано повећање концентрације испитиваног проапоптотичног протеина *Bax* за 55,2%, 37,3%, 40,9%, 43,8% и 48,3% у поређењу са *PC-3* ћелијама које нису третиране комплексима *C1-C5*.

Резултати наше студије су показали да након примене комплекса паладијума *C1*, *C2*, *C3*, *C4* и *C5* није дошло до сигнификантног смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) када говоримо о испитиваном антиапоптоичном *Bcl-2* протеину у односу на контролу популацију малигну хелија коју заправо чине нетретиране *PC-3* хелије (графикон 14). Када говоримо о контролној нетретираној популацији *PC-3* хелија, просечни интензитета флуоресценције је износио 222. Код третираних *PC-3* хелија комплексима паладијума *C1*, *C2*, *C3*, *C4* и *C5* просечни интензитет флуоресценције је износио редом: 176, 180, 186, 177 и 192.

Претходно поментути и добијени резултати у нашој студији недвосмислено указују да је код третираних *PC-3* хелија комплексима паладијума дошло до смањења односа *Bcl-2/Bax*, који је износио за комплексе *C1-C5* редом: 0,65, 0,76, 0,77, 0,71 и 0,75. Код популације малигну хелија које називамо контрола и које нису третиране комплексима паладијума *C1-C5*, однос *Bcl-2/Bax* је износио 1,3 (графикон 14).

Након показаног смањења односа *Bcl-2/Bax*, следећи корак у нашој студији је одређивање концентрације активне ефекторске каспазе-3. Прецизније, након примене комплекса паладијума *C1-C5* на *PC-3* хелије, јасно је уочено сигнификантно повећање процента малигну *PC-3* хелија које емитују флуоресценцију, у односу на нетретиране контролне хелије (графикон 14). Ово је јасан показатељ да је дошло до активације каспазе-3, односно да тестирани комплекси паладијума смањују стопу преживљавања *PC-3* хелија индукцијом унутрашњег митохондријалног пута апоптозе.



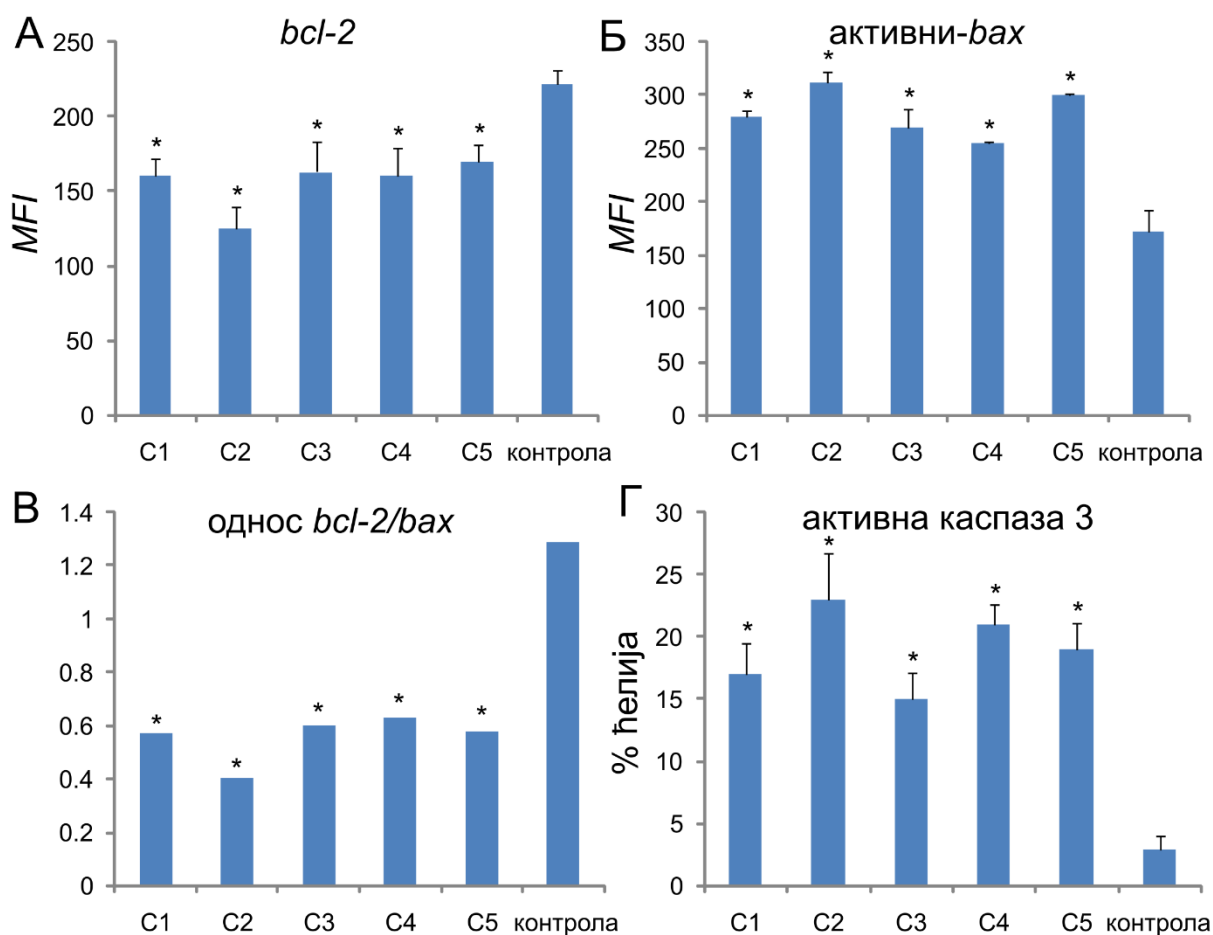
Графикон 14. Ефекат комплекса паладијума C1-C5 на концентрацију и активацију протеина апоптозе PC-3 ћелија карцинома простате. Репрезентативни дијаграми који показују MFI вредности протеина Bax и Bcl-2 као и Bcl-2/Bax количник после 24 часовног третмана PC-3 туморских ћелија IC₅₀ концентрацијом комплекса паладијума.

Резултати у нашој студији су показали да комплекси паладијума обележени као *C1*, *C2*, *C3*, *C4* и *C5* индукују сигнификантно повећање просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) када говоримо о проапоптотичном *Bax* протеину у поређењу са контролом коју чине нетретиране малигне *DU-145* ћелије (графикон 15). Прецизније, када говоримо о контролној нетретираној *DU-145* ћелијској популацији, просечан интензитет флуоресценције за испитивани активни *Bax* протеин је износио 170,2. Даље, просечан интензитет флуоресценције код *DU-145* ћелија које су третиране комплексима паладијума *C1-C5* након 24 часа раста у условима *in vitro* износио је редом: 280,3, 320,1, 275,4, 253,3 и 300,1. Такође, резултати наше студије су јасно показали да је код *DU-145* ћелија које су третиране комплексима паладијума (*C1-C5*) индуковано повећање концентрације проапоптотичног протеина *Bax* за 64,8%, 88,2%, 62,1%, 48,8% и 76,3% у поређењу са концентрацијом *Bax*-а у ћелијама које нису третиране комплексима паладијума.

Након примене комплекса паладијума *C1-C5* на *DU-145* ћелије дошло је до сигнификантног смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) када говоримо о антиапоптотичном *Bcl-2* протеину у односу на контролу коју чине нетретиране *DU-145* ћелије (графикон 15). Када говоримо о контролној популацији *DU-145* ћелија вредност просечног интензитета флуоресценције је износила 210,5. Код *DU-145* ћелија које су третиране комплексима паладијума *C1-C5* вредности просечног интензитета флуоресценције су износиле 165,4, 135,3, 180,3, 178,1 и 193,1. На основу претходно наведених вредности можемо јасно закључити да је код *DU-145* ћелија које су третиране паладијум комплексима дошло до смањења концентрације антиапоптотичног протеина *Bcl-2* за 21,5%, 35,8%, 14,4%, 15,4%, 8,3% у поређењу са контролом коју чине нетретиране ћелије.

Из претходно наведених резултата можемо недвосмислено видети да је дошло до пораста просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) *Bax*-а као и смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) *Bcl-2* протеина код *DU-145* ћелија које су третиране комплексима паладијума *C1-C5*. Све ово је условило смањење односа *Bcl-2/Bax*, који је износио за комплексе *C1-C5* редом: 0,58, 0,42, 0,65, 0,7 и 0,64. Код нетретиране контролне популације *DU-145* ћелија однос *Bcl-2/Bax* је износио 1,2 (графикон 15).

Након доказаног смањења односа *Bcl-2/Bax* код третираних *DU-145* ћелија, можемо закључити да комплекси паладијума *C1-C5* индукују апоптозу малигнућ ћелија активацијом унутрашњег митохондријалног апоптотичног пута. Стога, наредни корак у нашој студији је обухватио испитивање улоге активне ефекторске каспазе-3. Након третмана комплексима паладијума *C1-C5* на *DU-145* ћелије, детектовано је сигнификантно повећање процента малигнућ ћелија које емитују флуоресценцију. Прецизније, дошло је до сигнификантног повећања концентрације активираних каспазе-3 код *DU-145* ћелија које су третиране комплексима паладијума *C1-C5* у поређењу са контролном групом нетретираних малигнућ ћелија (графикон 15).



Графикон 15. Ефекат комплекса паладијума *C1-C5* на концентрацију и активацију протеина апоптозе *DU-145* ћелија карцинома простате. Репрезентативни дијаграми који показују *MFI* вредности протеина *Bax* и *Bcl-2* као и *Bcl-2/Bax* количник после 24 часовног третмана *DU-145* туморских ћелија IC_{50} концентрацијом комплекса паладијума.

8. ДИСКУСИЈА

Канцерогенеза је сложен процес који настаје услед малигне трансформације ћелија (130). Канцер је један од главних узрока смрти у индустријски развијеним земљама (130, 131). Стога, разумљиво је да малигнитети заправо репрезентују велики здравствени проблем у свету. Веома је битна чињеница да је у Србији забележен пораст инциденце, као и морталитета код пацијената код којих је постављена дефинитвна дијагноза карцинома у односу на Европу (8).

Канцерске ћелије поседују фундаментална својства која их раздвајају од малигно неизмењене ћелије, а једна од кључних карактеристика је неконтролисана пролиферација (99, 130, 131). Такође, веома је значајан и губитак физиолошке функције малигно измењене ћелије, као и процес метастазирања (60, 132). Када говоримо о молекуларним механизмима који имају есенцијалну улогу у малигној трансформацији ћелија, важно је напоменути да мутације у ДНК молекулу (које могу бити стечене или наследне) доводе до настанка туморске ћелије (99, 133). Уколико дође до малигне трансформације ћелије, долази и до поремећаја ћелијског циклуса, избегавања процеса апоптозе и повећане експресије онкогена (20, 99, 134).

Кључну улогу у малигној трансформацији ћелије има процес програмиране ћелијске смрти, апоптоза (135, 136). Многобројни сигнални путеви есенцијални за процес апоптозе су неактивни у малигним ћелијама. На тај начин туморска ћелија избегава улазак у процес апоптозе, што за последицу има неконтролисану пролиферацију малигне ћелије (135-137). Из претходно наведених чињеница јасно је да процес апоптозе може и мора бити важна мета за успешну антиканцерогену терапију.

Регулаторни протеини који имају есенцијалну улогу у контроли процеса апоптозе су *Bax* протеин који активира процес програмиране ћелијске смрти и протеин *Bcl-2* који инхибира активацију процеса програмиране ћелијске смрти (137, 138). Када говоримо о малигно трансформисаној ћелији уочена је повећана концентрација и активност антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, док је са друге стране смањена концентрација проапоптотичног *Bax* протеина (137-140).

Стога, циљ антитуморске терапије мора бити у смеру повећања концентрације проапоптотичног протеина *Bax*, при чему би се малигна ћелија увела у процес програмиране ћелијске смрти, апоптозе.

Осим избегавања процеса апоптозе, малигну ћелију карактерише и независност одвијања ћелијског циклуса од спољашњих сигнала (141, 142). Без обзира на сам патогенетски процес настајања малигне ћелије, већина туморских ћелија има добро развијене механизме помоћу којих преошћава *G1* кључне тачке ћелијског циклуса, чиме долази до неконтролисане деобе (95, 141).

Већина актуелних антиканцерских лекова, испољава антипролиферативни ефекат током *S* фазе ћелијског циклуса, чиме такође инхибирају раст и диференцијацију малигно неизмењених ћелија (99, 143). Стога, јасан недостатак антитуморске терапије је селективност. Поред тога, важно је напоменути да примена савремених хемиотерапеутика доводи до појаве озбиљних нежељених дејства код пацијената са дијагностикованим малигнитетом (144-128).

Можемо недвосмислено закључити да је проналажење нових потенцијалних хемиотерапеутика, који ће показати висок степен селективности као и мање нежељених ефеката, фундаментално у терапијском приступу карцинома.

У циљу проналажења потенцијалних хемиотерапеутика неопходно је њихово *in vitro* тестирање цитотоксичног ефекта на малигно измењене ћелије применом *MTT* теста.

Наша студија је истраживала цитотоксични ефекат пет новосинтетисаних *Pd(II)* комплекса обележених као *C1-C5* на стопу преживљавања *PC-3* и *DU-145* ћелија карцинома простате. У циљу детаљног и прецизног испитивања, такође је тестиран цитотоксични ефекат одговарајућих лиганата обележених као *L1-L5*.

Прво смо испитали ефекат комплекса паладијума, одговарајућих лиганата и цисплатине на *PC-3* ћелије карцинома простате.

Коначни епилог наше студије је недвосмислено потврдио да применом *C1-C5* паладијум комплекса долази до сигнификантног смањења стопе преживљавања *PC-3* ћелија у сва три испитивана временска интервала, након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro*. Вредности моларности паладијум комплекса *C1* која је неопходна да смањи стопа преживљавања *PC-3* ћелија за 50% је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 28,4 μ М, 14,8 μ М и 6,3 μ М. Када говоримо о паладијум комплексу *C2*, моларност која је неопходна да се смањи стопа преживљавања *PC-3* ћелија за 50% је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 28,9 μ М, 17,9 μ М и 8,5 μ М. Добијена IC_{50} вредност за паладијум комплекс *C3* је после 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 90,7 μ М, 41,8 μ М и 17,8 μ М. Даље, концентрација паладијум комплекса *C4* која је неопходна да се смањи стопа преживљавања *PC-3* ћелија за 50% је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 43,2 μ М, 23,01 μ М и 12,6 μ М. На крају, израчуната IC_{50} вредност за паладијум комплекс *C5* је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 43,3 μ М, 17,7 μ М и 9,1 μ М. Добијена IC_{50} вредност за цисплатину је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 97,9 μ М, 75,4 μ М и 49,4 μ М.

На основу израчунатих IC_{50} вредности испитиваних комплекса паладијума, можемо јасно рећи да је са временским повећањем периода раста у условима *in vitro* показан снажнији антитуморски ефекат на *PC-3* ћелије. Такође, ако упоредимо добијене IC_{50} вредности испитиваних паладијум комплекса и цисплатине можемо закључити да су *C1-C5* комплекси показали знатно ефикаснији односно снажнији цитотоксични ефекат у поређењу са цисплатином у сва три испитивана временска интервала.

За разлику од претходно наведених комплекса, када су у питању испитивани лигнанди можемо са сигурношћу закључити да су лигнанди показали веома слаб цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелије, а израчунате IC_{50} вредности за *L1-L5* су у сва три испитивана временска интервала износиле преко 200 μ М. На основу ових резултата можемо јасно тврдити да кључну улогу у антитуморском ефекту има присуство метала паладијума.

Многи тестирани комплекси који у својој структури садрже метал који није платина показали су снажан цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелије (147-149). Када говоримо о комплексима који садрже паладијум у својој хемијској структури, истраживање *Mbugua* и сарадника је показало да комплекс паладијума има снажан цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелије *in vitro* (150). Такође, комплекс паладијума синтетисан од стране *Valentini* и сарадника је показао снажан цитотоксични ефекат на *PC-3* малигне ћелије (151). Даље, комплекс паладијума који су синтетисали *Ulukaya* и сарадници је такође показао снажан цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелијској линији (127).

Све претходно поменуте студије укључујући и наше истраживање, јасно указују да *Pd(II)* комплекси значајно смањују стопу преживљавања *PC-3* ћелија.

Наша студија је такође обухватила испитивање ефекта комплекса паладијума, одговарајућих лиганата и цисплатине на *DU-145* ћелије карцинома простате.

Наведени резултати наше истраживачке студије су показали да испитивани комплекси *C1-C5* у сва три испитивана временска интервала, након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro*, доводе до значајног смањења стопе преживљавања туморских ћелија. Добијена IC_{50} вредност за паладијум комплекс *C1* је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 82,9 μ M, 50,3 μ M и 41,7 μ M. Моларност паладијум комплекса *C2* која смањује стопу преживљавања туморских *DU-145* ћелија за 50% је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 98,7 μ M, 47,8 μ M, 26,2 μ M. Даље, израчуната IC_{50} вредност за испитивани паладијум комплекс *C3* је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 60,8 μ M, 44,7 μ M и 36,5 μ M. Добијена IC_{50} вредност за паладијум комплекс *C4* је након три временска интервала раста у условима *in vitro* износила 134,9 μ M 59,1 μ M и 47,6 μ M. Моларност паладијум комплекса *C5* која смањује стопу преживљавања испитиваних *DU-145* ћелија за 50% је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 111,8 μ M 55,1 μ M и 38,9 μ M. Израчуната IC_{50} вредност за цисплатину је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила 134,5 μ M, 57,2 μ M и 49,2 μ M.

На предходном примеру описаних резултата можемо јасно закључити да су тестирани комплекси паладијума показали снажан цитотоксични ефекат, сличан ефекат је показала и цисплатина. Такође, ако упоредимо израчунате IC_{50} вредности између испитиваних комплекса паладијума, можемо јасно закључити да је комплекс *C2* показао најснажнији антитуморски учинак у поређењу са осталим испитиваним супстанцама. Веома је битна чињеница да је комплекс паладијума *C2* је имао знатно снажнији цитотоксични ефекат када поредимо са антитуморским ефектом лека цисплатине.

На темељу потврђених IC_{50} концентрација за *L1-L5* током 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* можемо констатовати да су тестирани лиганди показали веома слаб цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелије, где су IC_{50} вредности износиле преко 200 μ M. Резултати нам заправо јасно указују да је за снажан цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелије неопходно присуство метала, паладијума.

Различите студије су показале да комплекси који у својој структури садрже метал који није платина имају снажан цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелије карцинома простате *in vitro* (152-154). Истраживање *Rocha* и сарадника је показало да тестирана четири комплекса паладијума показују снажан цитотоксични ефекат, односно значајно смањују стопу преживљавања *DU-145* ћелија *in vitro* (155). Такође, истраживачка публикација реализована од стране *Hernández* и сарадника је јасно демонстрирала како пет *Pd(II)* комплекса имају снажан цитотоксични ефекат и смањују стопу преживљавања туморских *DU-145* ћелија (156). Даље, *Carreira* и сарадници су у њиховој студији недвосмислено доказали снажан цитотоксични ефекат комплекса паладијума на *DU-145* малигне ћелије (157).

Можемо јасно закључити да су резултати наше студије слични као и резултати претходно наведених студија.

У циљу проналажења нових хемиотерапеутика, потребно је да испитивана супстанца или комплекс поседује висок степен селективности према малигну измењеним ћелијама. Прецизније, неопходно је да потенцијални испитивани хемиотерапеутик показује снажан цитотоксични ефекат на туморске ћелије, односно веома слаб

цитотоксични ефекат према малигно неизмењеним ћелијама. Из претходно наведених разлога, наше истраживање је обухватило испитивање цитотоксичног утицаја комплекса паладијума *C1-C5* на малигно неизмењене *MRC-5* ћелије, фибробласте. Добијени резултати наше студије су јасно показали да свих пет испитиваних паладијум комплекса демонстрирају незнатан антитуорски ефекат на *MRC-5* фибробласте у сва три испитивана временска интервала. Израчуната IC_{50} вредност за паладијум комплекс *C1* је након три тестирана временска интервала, раста у условима *in vitro* износила $>200\mu\text{M}$, $>200\mu\text{M}$ и $182,1\mu\text{M}$. Добијена моларна концентрација паладијум комплекса *C2* која смањује стопу преживљавања испитиваних *MRC-5* фибробласта за половину вредности је након испитивана три временска интервала, раста у условима *in vitro* износила $>200\mu\text{M}$, $>200\mu\text{M}$ и $196,2\mu\text{M}$. Даље, добијена IC_{50} вредност за комплекс паладијума који је обележен као *C3* је у сва три испитивана инкубациона интервала износила $>200\mu\text{M}$, $>200\mu\text{M}$ и $152,4\mu\text{M}$. Комплекс паладијума обележен као *C4* је показао веома слаб цитотоксични ефекат на *MRC-5* фибробласте, а израчуната IC_{50} вредност је након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* износила $>200\mu\text{M}$, $>200\mu\text{M}$ и $>200\mu\text{M}$. Након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* IC_{50} вредност за комплекс паладијума *C5* је износила $>200\mu\text{M}$, $>200\mu\text{M}$ и $>200\mu\text{M}$. За разлику од испитиваних комплекса паладијума, цисплатина је показала снажан цитотоксични ефекат на малигно неизмењене фибробласте. Израчуната IC_{50} вредност за цисплатину након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* је достигла $198,2\mu\text{M}$, $116,7\mu\text{M}$ и $20,7\mu\text{M}$.

На основу описаних резултата, јасно је да су тестирани комплекси паладијума обележени као *C1-C5* показали висок степен селективности према малигним ћелијама простате, док је цитотоксични ефекат према фибробластима био веома слаб.

У нашем истраживању испитиван је и цитотоксични ефекат одговарајућих лиганата обележених као *L1-L5* на малигно неизмењене фибробласте. Израчунате IC_{50} вредности за *L1-L5* након 24, 48 и 72 часа раста у условима *in vitro* су износиле преко $200\mu\text{M}$.

Студија *Svoboda* и сарадника је обухватила испитивање цитотоксичног ефекта три комплекса који у својој структури садрже паладијум, на различите туморске ћелије као и малигно неизмењене фибробласте. Показано је да сва три испитивана комплекса имају снажан цитотоксични ефекат како на туморске ћелије тако и на фибробласте (158). За разлику од претходно поменуте студије, свих пет комплекса паладијума који су испитивани у нашој студији су показали знатно већи степен селективности, односно слаб цитотоксични ефекат на фибробласте. Истраживање *Omondi* и сарадника је недвосмислено показало да четири испитивана комплекса паладијума имају снажан цитотоксични ефекат на малигно неизмењене фибробласте *MRC-5* (125). Такође, и у овом случају резултати показују да комплекси испитивани у нашој студији недвосмислено поседују већи степен селективности, односно знатно слабији цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелије. Истраживање спроведено од стране *Јоксимовића* и сарадника је показало да комплекси паладијума имају висок степен селективности, прецизније веома слаб цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелије што је у сагласности са нашим истраживањем (124).

На крају, ако упоредимо све IC_{50} вредности израчунате за испитиване *C1-C5* комплексе, можемо јасно дефинисати у нашем закључку да су тестиране супстанце ипак значајно јачи антитуморски ефекат показале на *PC-3* ћелије када упоредимо са антитуморским ефектом на *DU-145* ћелије. Најснажнији цитотоксични ефекат на *PC-3* ћелије је показао комплекс обележен као *C1*. Са друге стране, комплекс обележен као *C2* је показао најснажнији антитуморски потенцијал на *DU-145* ћелије у односу на остале

испитиване супстанце. Веома је значајно напоменути да су испитивани комплекси паладијума имали снажнији цитотоксични ефекат на ћелије карцинома простате чак и од цисплатине. Осим тога, јасно можемо тврдити да сви испитивани комплекси испољавају веома слаб цитотоксични ефекат на фибробласте за разлику од цисплатине, где је јасно показано да са порастом периода раста у условима *in vitro* знатно се смањује стопа преживљавања малигно неизмењених ћелија. Након јасно показане антитуморске активности као и селективности испитиваних комплекса паладијума, следећи корак нашег истраживања је обухватио молекуларни механизам деловања комплекса паладијума.

Малигне ћелије се карактеришу по дедиференцијацији, инвазивности и метастазирању. Када говоримо о приступу лечења свих малигнитета разликујемо три принципа, хирушка ексизија, зрачење и хемиотерапија. Једна од фундаменталних карактеристика за хемиотерапију је могућност да се примени самостално, а такође као додатак неком другом облику лечења. Један од кључних разлога зашто малигно измењене ћелије неконтролисано пролиферишу је промена у сигналиним путевима програмиране ћелијске смрти, апоптозе.

Такође, поремећај у сигналним путевима апоптозе повезан је са развојем резистенције на примену цитостатика. Ако погледамо најчешћи механизам деловања различитих цитостатика, можемо закључити да делују тако што оштећују ДНК молекул малигне ћелије и иницирају апоптозу.

Резултати наше студије су показали да је паладијум комплекс обележен као *C1* умањио стопу преживљавања *PC-3* малигнућ ћелија при чему се 29,9% малигнућ ћелија налазило у раној фази апоптозе, док је 17,4% ћелија било у фази касне апоптозе. Такође, 52,4% *PC-3* малигнућ ћелија је било вијабилно, док је било мање од 1% некротичних ћелија.

Комплекс паладијума обележен као *C2* је након 24 часа раста у условима *in vitro* умањио стопу преживљавања испитиваних *PC-3* ћелија, при чему се 44,8% ћелија налазило у фази раној апоптској фази, а 9,8% ћелија се налазило у касној апоптотској фази. Даље, 45,1% ћелија је било вијабилно, а налазило се мање од 1% некротичних ћелија.

Испитивањем антитуморског ефекта комплекса паладијума *C3* резултати су јасно показали да је након 24 часа раста у условима *in vitro* умањио стопу преживљавања *PC-3* малигнућ ћелија, где је 38,5% ћелија детектовано у раној апоптотској фази, док се 11,8% ћелија налазило у фази касне апоптозе. Процент вијабилних ћелија је износио 49%, док је мање од 1% детектовано некротичних ћелија.

Комплекс паладијума обележен као *C4* је након 24 часа раста у условима *in vitro* умањио стопу преживљавања испитиваних туморских *PC-3* ћелија при чему је 39,5% ћелија детектовано у раној апоптози, док је 13% ћелија било у фази касне апоптозе. Процент вијабилних ћелија је износио 47%, док је проценат некротичних ћелија износио мање од 1%.

Комплекс паладијума *C5* је умањио стопу преживљавања малигнућ *PC-3* ћелија, где се 35,8% ћелија детектовано у раној апоптској фази, 7,7% ћелија се налазило у стадијуму касне апоптозе. Процент вијабилних ћелија је износио 54,8%, док је проценат некротичних ћелија износио 1,6%.

Паладијум комплекс *C1* је након 24 часа раста у условима *in vitro* умањио стопу преживљавања *DU-145* ћелија, при чему је 23,9% ћелија детектовано у фази ране

апоптозе, док је 5,9% ћелија било у стадијуму касне апоптозе. Такође, проценат вијабилних ћелија је износио 69,9%, док је проценат некротичних ћелија износио мање од 1%.

Резултати наше студије су показали да *C2* комплекс умањује стопу преживљавања *DU-145* ћелија, при чему се 22,5% испитиваних ћелија налазило у стадијуму ране апоптозе, док је проценат ћелија у стадијуму касне апоптозе износио 13,8%. Процент вијабилних *DU-145* ћелија је износио 63,5%, док је проценат испитиваних ћелија у стадијуму некрозе износио мање од 1%.

Комплекс паладијума *C3* је умањио стопу преживљавања испитиваних *DU-145* ћелија, прецизније 16,6% ћелија се налазило у стадијуму ране програмиране ћелијске смрти, а 12,1% малигнућ ћелија је било у стадијуму касне апоптозе. Процент вијабилних испитиваних *DU-145* ћелија је износио 71%, док је некротичних ћелија било мање од 1%.

Паладијум комплекс обележен као *C4* је показао цитотоксични ефекат на испитиване *DU-145* ћелије, при чему је 13,8% ћелија било у стадијуму ране апоптозе док је 5,3% ћелија детектовано у стадијуму касне апоптозе. Такође, проценат вијабилних ћелија је износио 79,9% док је некротичних ћелија било 1%.

Комплекс паладијума обележен као *C5* је умањио стопу преживљавања испитиваних *DU-145* ћелија при чему се 20,1% ћелија налазило у раној апоптози, а 7,75% ћелија у касној апоптози. Даље, проценат вијабилних *DU-145* ћелија је износио 72,1% док је некротичних ћелија било 1%.

Ако погледамо резултате наше студије јасно је да су свих пет испитиваних комплекса паладијума обележених *C1-C5* умањили стопу преживљавања *PC-3* као и *DU-145* малигнућ ћелија, тако што активирају процес програмиране ћелијске смрти, апоптозе. Такође, на основу претходно дефинисаних резултата може се недвосмислено закључити да само минимални проценат испитиваних малигнућ ћелија се налази у стадијуму некрозе, што такође иде у прилог да испитивани комплекси индукују апоптозу.

Различите студије су показале да комплекси паладијума индукују процес апоптозе и на тај начин смањују стопу преживљавања малигнућ измењених ћелија. Паладијум комплекс који су синтетисали *Valentini* и сарадници је исто као и паладијум комплекси у нашој студији, индуковао процес апоптозе и на тај начин смањио стопу преживљавања испитиваних малигнућ ћелија (151). Такође, истраживање публиковано од стране *Ulukaya* и сарадника је показало да паладијум комплекс индукује смањује стопе преживљавања ћелија карцинома простате активацијом процеса апоптозе, прецизније то је у сагласности са резултатима добијеним у нашој студији (127). Паладијум комплекси синтетисани од стране *Carreira* и сарадника (157), *Espino* и сарадника (126) и *Ari* и сарадника (159) су као и наши испитивани паладијум комплекси смањили стопу преживљавања малигнућ измењених ћелија индукцијом процеса програмиране ћелијске смрти.

Снажан цитотоксични ефекат, односно пад стопе преживљавања малигнућ ћелија може се индуковати активацијом процеса апоптозе као и блокирањем ћелијског циклуса, чиме се зауставља деоба туморских ћелија. У нашој студији смо детаљно испитали и колико процентуално малигнућ измењених ћелија се налазе у различитим фазама ћелијског циклуса, а туморске ћелије смо претходно третирали испитиваним паладијум комплексима *C1-C5*.

Резултати наше студије су показали да испитивани комплекс паладијума *C1* не доводи до застоја у ћелијском циклусу *PC-3* ћелија. Можемо јасно закључити да комплекс паладијума *C1* смањује стопу преживљавања *PC-3* ћелија искључиво индукцијом апоптозе, без утицаја на ћелијски циклус туморских ћелија. За разлику од *C1* комплекса, испитивани *C2-C5* заустављају ћелијски циклус у *G2/M* фази. Прецизније, паладијум комплекси *C2-C5* смањују стопу преживљавања туморских *PC-3* ћелија комбинацијом активације процеса апоптозе као и заустављањем ћелијског циклуса.

Резултати наше студије који се односе на ћелијски циклус *DU-145* ћелија недвосмислено показују да испитивани комплекси паладијума обележени као *C1*, *C3*, *C4* и *C5* доводе до потпуног прекида одвијања *G0/G1* фазе ћелијског циклуса. За разлику од претходно поменутих супстанци, комплекс паладијума *C2* је зауставио ћелијски циклус *DU-145* ћелија у *S* фази. Можемо јасно закључити да свих пет испитиваних комплекса паладијума показују снажан цитотоксични ефекат на *DU-145* ћелије активацијом процеса апоптозе и заустављањем ћелијског циклуса.

Осим индукције процеса апоптозе, различите студије су показале да паладијум комплекси могу свој антитуморски ефекат остварити и заустављањем ћелијског циклуса. Студија *Hadizadeh* и сарадника је јасно показала да три синтетисана, испитивана комплекса паладијума засунављају ћелијски циклус у *G2/M* фази и на тај начин смањују стопу преживљавања туморских ћелија (160). Такође, резултати студије *Li* и сарадника су показали да испитивани комплекс паладијума индукује застој у *S* фази ћелијског циклуса (161). Научна студија спроведена од стране *Bjelogrlic* и сарадника јасно нам указује да испитивани комплекси паладијума индукују застој ћелијског циклуса малигних ћелија у *G0/G1* фази (162).

Наша студија је недвосмислено демонстрирала сигнификантан пораст концентрације проапоптотичних протеина као што је *Bax* код *PC-3* и *DU-145* испитиваних малигних ћелија. Такође, јасно и прецизно смо демонстрирали да долази до сигнификантног смањења концентрације антиапоптотични протеина *Bcl-2*. Ако детаљно погледамо однос концентрација *Bcl-2/Bax* протеина јасно је да тестирани комплекси паладијума обележени као *C1-C5* свој антиканцерски ефекат остварују преко унутрашњег митохондријалног пута. У прилог томе, нам говори и повећан проценат ћелија код којих је присутна активна егзекуторска каспаза 3.

На основу наше студије као и претходно наведених научних истраживања можемо јасно уочити да испитивани *Pd(II)* комплекси индукују процес апоптозе, заустављају ћелијски циклус у различитим фазама као и да комбинацијом ова два механизма показују снажан цитотоксични ефекат на малигно измењене ћелије

9. ЗАКЉУЧАК

На основу детаљних и темељних података добијених у нашој студији можемо извести више фундаменталних закључака:

1. Синтетисани комплекси паладијума(II) *C1-C5* су јасно демонстрирали сигнификантан антитуморски ефекат на тестираним *PC-3* и *DU-145* ћелијама карцинома простате, уз велики степен селективности (минималан антитуморски ефекат) према малигно неизмењеним ћелијама фибробластима, *MRC-5*.
2. Одговарајући лиганди обележени као *L1-L5* су показали минималан антитуморски ефекат на тестираним *PC-3* и *DU-145* ћелијама карцинома простате као минимални ефекат на малигно неизмењеним фибробластима *MRC-5*.
3. На основу претходна два навода можемо јасно и недвосмислено закључити да је за цитотоксични ефекат испитиваних супстанци кључну улогу имао метал паладијум и његова редокс активност.
4. Тестирани комплекси паладијума(II) су доводили до прекида одвијања ћелијског циклуса малигнућелија и на тај начин смањивали значајно стопу преживљавања *PC-3* и *DU-145* малигнућелија.
5. Од есенцијалног је значаја да је у нашој студији показано да осим утицаја на ћелијски циклус, испитивани комплекси паладијума(II) код канцерских ћелија условљавају висок степен умањења односа *Bcl-2/Bax* протеина, што за директну последицу има повећан проценат тестираних канцерских ћелија које садрже активiranу каспазу-3, која даље генерише промоцију митохондријалног пута програмиране ћелијске смрти *PC-3* и *DU-145* ћелија.

10. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Hausman DM. What Is Cancer? *Perspect Biol Med*. 2019;62(4):778-84.
2. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*. 2019;92:121-135.
3. Xia L, Oyang L, Lin J, Tan S, Han Y, Wu N, Yi P, Tang L, Pan Q, Rao S, Liang J, Tang Y, Su M, Luo X, Yang Y, Shi Y, Wang H, Zhou Y, Liao Q. The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Mol Cancer*. 2021 Feb 5;20(1):28. doi: 10.1186/s12943-021-01316-8.
4. da Silva-Diz V, Lorenzo-Sanz L, Bernat-Peguera A, Lopez-Cerda M, Muñoz P. Cancer cell plasticity: Impact on tumor progression and therapy response. *Semin Cancer Biol*. 2018;53:48-58.
5. Sun W, Shi Q, Zhang H, Yang K, Ke Y, Wang Y, Qiao L. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discov Med*. 2019;27(146):45-55.
6. Hulvat MC. Cancer Incidence and Trends. *Surg Clin North Am*. 2020;100(3):469-81.
7. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
8. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer*. 2013;13:18.
9. Belli C, Trapani D, Viale G, D'Amico P, Duso BA, Della Vigna P, Orsi F, Curigliano G. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018;65:22-32.
10. Marjanovic ND, Hofree M, Chan JE, Canner D, Wu K, Trakala M, Hartmann GG, Smith OC, Kim JY, Evans KV, Hudson A, Ashenberg O, Porter CBM, Bejnood A, Subramanian A, Pitter K, Yan Y, Delorey T, Phillips DR, Shah N, Chaudhary O, Tsankov A, Hollmann T, Rekhtman N, Massion PP, Poirier JT, Mazutis L, Li R, Lee JH, Amon A, Rudin CM, Jacks T, Regev A, Tammela T. Emergence of a High-Plasticity Cell State during Lung Cancer Evolution. *Cancer Cell*. 2020;38(2):229-246.
11. Lemaire J, Larrue R, Perrais M, Cauffiez C, Pottier N. Aspects fondamentaux du développement tumoral [Fundamental aspects of oncogenesis]. *Bull Cancer*. 2020;107(11):1148-60.
12. Basu AK. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):970.
13. Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends Cell Biol*. 2020;30(10):764-76.
14. Strausova biokemija
15. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019;22;26(1):1-7.
16. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*. 2010;31(10):1703-09.
17. Stapelfeld C, Dammann C, Maser E. Sex-specificity in lung cancer risk. *Int J Cancer*. 2020;146(9):2376-82.
18. Thandapani P. Super-enhancers in cancer. *Pharmacol Ther*. 2019;199:129-138.
19. Weiss RA. A perspective on the early days of RAS research. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(4):1023-8.
20. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. 2020;40(11):6009-15.

21. Witek Ł, Janikowski T, Gabriel I, Bodzek P, Olejek A. Analysis of microRNA regulating cell cycle-related tumor suppressor genes in endometrial cancer patients. *Hum Cell*. 2021;34(2):564-69.
22. Han A, Purwin TJ, Aplin AE. Roles of the BAP1 Tumor Suppressor in Cell Metabolism. *Cancer Res*. 2021 Jun 1;81(11):2807-14.
23. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682-9.
24. Chen S, Li F, Xu D, Hou K, Fang W, Li Y. The Function of RAS Mutation in Cancer and Advances in its Drug Research. *Curr Pharm Des*. 2019;25(10):1105-14.
25. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*. 2017;8(4):116.
26. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-30.
27. Shoshani O, Brunner SF, Yaeger R, Ly P, Nechemia-Arbely Y, Kim DH, Fang R, Castillon GA, Yu M, Li JSZ, Sun Y, Ellisman MH, Ren B, Campbell PJ, Cleveland DW. Chromothripsis drives the evolution of gene amplification in cancer. *Nature*. 2021;591(7848):137-41.
28. Vredevoogd DW, Peeper DS. Enabling oncogenes. *Science*. 2021;373(6559):1088-89.
29. Matanes E, Volodarsky-Perel A, Eisenberg N, Rottenstreich M, Yasmeen A, Mitric C, Lau S, Salvador S, Gotlieb WH, Kogan L. Endometrial Cancer in Germline BRCA Mutation Carriers: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2021;28(5):947-56.
30. Saghaeiannejad Esfahani H, Vela CM, Chauhan A. Prevalence of TP-53/Rb-1 Co-Mutation in Large Cell Neuroendocrine Carcinoma. *Front Oncol*. 2021.doi: 10.3389/fonc.2021.653153.
31. Raizis AM, Racher HM, Foucal A, Dimaras H, Gallie BL, George PM. DNA hypermethylation/boundary control loss identified in retinoblastomas associated with genetic and epigenetic inactivation of the *RB1* gene promoter. *Epigenetics*. 2021;16(9):940-54.
32. Xu J, Li N, Deng W, Luo S. Discovering the mechanism and involvement of the methylation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene and its special locus region in gastric cancer. *Bioengineered*. 2021;12(1):1286-98.
33. Wan J, Zhang J, Zhang J. Expression of p53 and its mechanism in prostate cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(1):378-82.
34. Zhu G, Pan C, Bei JX, Li B, Liang C, Xu Y, Fu X. Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Front Oncol*. 2020. doi: 10.3389/fonc.2020.595187.
35. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, Morrione A, Giordano A, Cenciarelli C. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int*. 2021 Dec 24;21(1):703.
36. Muto Y, Ryo E, Namikawa K, Takahashi A, Ogata D, Fujimura T, Yatabe Y, Aiba S, Yamazaki N, Mori T. RB1 gene mutations are a distinct predictive factor in Merkel cell carcinoma. *Pathol Int*. 2021;71(5):337-47.
37. Mendonça V, Evangelista AC, P Matta B, M Moreira MÂ, Faria P, Lucena E, Seuánez HN. Molecular alterations in retinoblastoma beyond RB1. *Exp Eye Res*. 2021. doi: 10.1016/j.exer.2021.108753.
38. Casaubon JT, Kashyap S, Regan JP. BRCA 1 and 2. 2021 Sep 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 29262038.
39. Hobbs EA, Litton JK, Yap TA. Development of the PARP inhibitor talazoparib for the treatment of advanced *BRCA1* and *BRCA2* mutated breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2021;22(14):1825-37.

40. Conduit C, Milne RL, Friedlander ML, Phillips KA. Bilateral Salpingo-oophorectomy and Breast Cancer Risk for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: Assessing the Evidence. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021;14(11):983-94.
41. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. *BRCA1*- and *BRCA2*-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.
42. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*. 2014;15(3):266-82.
43. Ahmadi Ghezeldasht S, Shirdel A, Assarehzadegan MA, et al. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Oncogenesis: Molecular Aspects of Virus and Host Interactions in Pathogenesis of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATL). *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(3):179-95.
44. Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol*. 2020;10:3116.
45. Xie Y. Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1018:11-21.
46. Yin H, Qu J, Peng Q, Gan R. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(5):573-83.
47. Villa E, Ali ES, Sahu U, Ben-Sahra I. Cancer Cells Tune the Signaling Pathways to Empower de Novo Synthesis of Nucleotides. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):688.
48. Ahn CS, Metallo CM. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab*. 2015;3(1):1.
49. Laham-Karam N, Pinto GP, Poso A, Kokkonen P. Transcription and Translation Inhibitors in Cancer Treatment. *Front Chem*. 2020;8:276.
50. Chaturvedi NK, Kling MJ, Griggs CN, Keshewani V, Shukla M, McIntyre EM, Ray S, Liu Y, McGuire TR, Sharp JG, Band H, Joshi SS, Coulter DW. A Novel Combination Approach Targeting an Enhanced Protein Synthesis Pathway in MYC-driven (Group 3) Medulloblastoma. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(6):1351-62.
51. Guo W, Li K, Sun B, Xu D, Tong L, Yin H, Liao Y, Song H, Wang T, Jing B, Hu M, Liu S, Kuang Y, Ling J, Li Q, Wu Y, Wang Q, Yao F, Zhou BP, Lin SH, Deng J. Dysregulated Glutamate Transporter SLC1A1 Propels Cystine Uptake via Xc⁻ for Glutathione Synthesis in Lung Cancer. *Cancer Res*. 2021;81(3):552-66.
52. Shiratori R, Furuichi K, Yamaguchi M, Miyazaki N, Aoki H, Chibana H, Ito K, Aoki S. Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Sci Rep*. 2019;9(1):18699.
53. Bose S, Le A. Glucose Metabolism in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1063:3-12.
54. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol*. 2019;9:1143.
55. Yang HC, Wu YH, Yen WC, et al. The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells*. 2019;8(9):1055.
56. Zambrano A, Molt M, Uribe E, Salas M. Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3374.
57. Efthymiou G, Saint A, Ruff M, Rekad Z, Ciais D, Van Obberghen-Schilling E. Shaping Up the Tumor Microenvironment With Cellular Fibronectin. *Front Oncol*. 2020;10:641.
58. Kai F, Drain AP, Weaver VM. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev Cell*. 2019 May 6;49(3):332-46.

59. Xiao J, Yang W, Xu B, Zhu H, Zou J, Su C, Rong J, Wang T, Chen Z. Expression of fibronectin in esophageal squamous cell carcinoma and its role in migration. *BMC Cancer*. 2018;18(1):976.
60. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):28.
61. Juliá-Romero C, Rechi-Sierra K, Juan-Escudero JU. Nuevas recomendaciones en el screening de cáncer de próstata mediante PSA [New recommendations for prostate cancer screening with PSA]. *Semergen*. 2021;47(5):342-47.
62. Persaud H, Yuan J, Afable A, Bruno DM. Barriers to Prostate Cancer Screening Among Indo-Guyanese. *J Community Health*. 2021;46(3):591-96.
63. Montañó JJ, Barceló A, Franch P, et al. Prostate Cancer Survival by Risk and Other Prognostic Factors in Mallorca, Spain. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(21):11156.
64. Bechis SK, Carroll PR, Cooperberg MR. Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):235-41.
65. Oczkowski M, Dziendzikowska K, Pasternak-Winiarska A, Włodarek D, Gromadzka-Ostrowska J. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. *Nutrients*. 2021;13(2):496.
66. Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol*. 2017;27(1):3-10.
67. Lesko SM, Rosenberg L, Shapiro S. Family history and prostate cancer risk. *Am J Epidemiol*. 1996 Dec 1;144(11):1041-7.
68. Trudeau K, Rousseau MC, Parent MÉ. Extent of Food Processing and Risk of Prostate Cancer: The PROtEuS Study in Montreal, Canada. *Nutrients*. 2020;12(3):637.
69. Velimirovic M. *Karcinom Prostate*. Velarta, Beograd. 2007.
70. Maksimovic Z. *Hirurgija*. Cibid, Beograd. 2008.
71. Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med*. 2019;70:479-99.
72. Zhang X. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2019;39(1):76.
73. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017;317(24):2532-42.
74. Shariat SF, Roehrborn CG. Using biopsy to detect prostate cancer. *Rev Urol*. 2008;10(4):262-80.
75. Hansen ST, Lund M, Ostergaard LD, Lund L. Role of regenerative therapies on erectile dysfunction after radical prostatectomy. *Int J Impot Res*. 2021;33(4):488-96.
76. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
77. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019 Jan 18;39(1):BSR20180992.
78. Galluzzi L, Green DR. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*. 2019;177(7):1682-99.
79. Pijnenburg L, Felten R, Javier RM. Ostéonécroses aseptiques, une revue générale des ostéonécroses de la hanche, et au-delà [A review of avascular necrosis, of the hip and beyond]. *Rev Med Interne*. 2020 Jan;41(1):27-36.
80. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*. 2021;81(4):1133-43.
81. Castillo Ferrer C, Berthenet K, Ichim G. Apoptosis - Fueling the oncogenic fire. *FEBS J*. 2021;288(15):4445-63.

82. Dadsena S, King LE, García-Sáez AJ. Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2021;1863(12):183716.
83. Singh P, Lim B. Targeting Apoptosis in Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2022. doi: 10.1007/s11912-022-01199-y.
84. Ivanisenko NV, Seyrek K, Hillert-Richter LK, König C, Espe J, Bose K, Lavrik IN. Regulation of extrinsic apoptotic signaling by c-FLIP: towards targeting cancer networks. *Trends Cancer.* 2021. doi: 10.1016/j.trecan.2021.12.002.
85. Hegazy AM, Chen N, Lin H, Babu V S, Li F, Yang Y, Qin Z, Shi F, Li J, Lin L. Induction of apoptosis in SSN-1 cells by Snakehead Fish Vesiculovirus (SHVV) via Matrix protein dependent intrinsic pathway. *Fish Shellfish Immunol.* 2021;113:24-34.
86. Helaly NA, Esheba NE, Ammo DEA, Elwan NM, Elkholy RA. High Bax/Bcl-2 ratio is associated with good prognosis and better survival in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2021;107:106604.
87. Zhao H. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review in "Apoptosis and Medicine". InTech, Rijeka, Croatia. 2012.
88. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008;27(48):6194-206.
89. 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 Biol.* 2013;14:32.
90. Si Ming M, Thirumala-Devi K. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2016;16:7–21.
91. Aral K, Aral CA, Kapila Y. The role of caspase-8, caspase-9, and apoptosis inducing factor in periodontal disease. *J Periodontol.* 2019;90(3):288-94.
92. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):12815-9.
93. Suski JM, Braun M, Strmiska V, Sicinski P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell.* 2021 Jun 14;39(6):759-78.
94. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.
95. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):74-88.
96. Coussy F, Deluche E, Pistilli B, Ladoire S, Ferrero JM, Cottu P. Place des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines 4/6 dans la prise en charge du cancer du sein avancé [Targeting the cyclin-dependent kinases 4/6 in advanced breast cancers]. *Bull Cancer.* 2021;108(9):843-854.
97. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(3):a026104.
98. Petrović M, Todorović D. Apoptoza i ćelijski ciklus. *Racionalna terapija.* 2014;6(1):21-32.
99. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija. Data status, Beograd.* 2005.
100. Jankovic S. *Farmakologija i toksikologija. Medicinski Fakultet Kragujevac, Kragujevac.* 2003.
101. Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Abak A, Seify M, Mohaqiq M, Keshmir F, Taheri M, Ayatollahi SA. Effects of chemotherapeutic agents on male germ cells and possible ameliorating impact of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 2021;142:112040.

102. Franzoi MA, Agostinetti E, Perachino M, Del Mastro L, de Azambuja E, Vaz-Luis I, Partridge AH, Lambertini M. Evidence-based approaches for the management of side-effects of adjuvant endocrine therapy in patients with breast cancer. *Lancet Oncol.* 2021;22(7):e303-e313.
103. Yamada Y, Beltran H. The treatment landscape of metastatic prostate cancer. *Cancer Lett.* 2021;519:20-9.
104. Renfrew AK. Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics.* 2014;6(8):1324-35.
105. Čanović P, Simović AR, Radisavljević S, Bratsos I, Demitri N, Mitrović M, Zelen I, Bugarčić ŽD. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem.* 2017;22(7):1007-28.
106. Marloye M, Berger G, Gelbcke M, Dufrasne F. A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. *Future Med Chem.* 2016;8(18):2263-86.
107. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:599-616.
108. Fernandes ARDS, de Brito GA, Baptista AL, Andrade LAS, Imanishe MH, Pereira BJ. The influence of acute kidney disease on the clinical outcomes of patients who received cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Health Sci Rep.* 2022;5(1):e479.
109. Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann Pharm Fr.* 2011;69(6):286-95.
110. Sharma NK, Ameta RK, Singh M. Biological Impact of Pd (II) Complexes: Synthesis, Spectral Characterization, In Vitro Anticancer, CT-DNA Binding, and Antioxidant Activities. *Int J Med Chem.* 2016;2016:9245619.
111. Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Amir S, Husain FM, Alsalmeh A, Siddiqui MA, AlKhedhairi AA, Khan RA. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. *Sci Rep.* 2019; 27;9(1):5237.
112. Alessio E, Messori L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules.* 2019;24(10):1995.
113. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
114. Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S, Yu L. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol.* 2020 20;11:343.
115. Wangpaichitr M, Theodoropoulos G, Nguyen DJM, et al. Cisplatin Resistance and Redox-Metabolic Vulnerability: A Second Alteration. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7379.
116. Chen HH, Kuo MT. Role of glutathione in the regulation of Cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Met Based Drugs.* doi:10.1155/2010/430939.
117. Hamano H, Ikeda Y, Goda M, Fukushima K, Kishi S, Chuma M, Yamashita M, Niimura T, Takechi K, Imanishi M, Zamami Y, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Miyamoto L, Ishizawa K, Fujino H, Tamaki T, Aihara KI, Tsuchiya K. Diphenhydramine may be a preventive medicine against cisplatin-induced kidney toxicity. *Kidney Int.* 2021;99(4):885-99.
118. Assi S, Barling M, Al-Hamid A, Cheema E. Exploring the adverse effects of chemotherapeutic agents used in the treatment of cervical and ovarian cancer from the

- patients' perspective: a content analysis of the online discussion forums. *Eur J Hosp Pharm.* 2021;28(Suppl 2):e35-e40.
119. Abadi AJ, Mirzaei S, Mahabady MK, Hashemi F, Zabolian A, Hashemi F, Raei P, Aghamiri S, Ashrafizadeh M, Aref AR, Hamblin MR, Hushmandi K, Zarrabi A, Sethi G. Curcumin and its derivatives in cancer therapy: Potentiating antitumor activity of cisplatin and reducing side effects. *Phytother Res.* 2021. doi: 10.1002/ptr.7305.
 120. A. M. White and H. B. Friedman. On the discovery of palladium. *Journal of Chemical Education* 1932. DOI: 10.1021/ed009p236.
 121. Jiang T, Jiang F, Zhuo Z, Liu H, Hu B, Li M, Li L, Huang Z, Zhou Z, Zhu Z. Comparative study on a kilowatt-MPT-MS-based method with two ion polarity modes for the inert palladium metal. *Analyst.* 2021;146(5):1760-71.
 122. Carneiro TJ, Martins AS, Marques MPM, Gil AM. Metabolic Aspects of Palladium(II) Potential Anti-Cancer Drugs. *Front Oncol.* 2020;12;10:590970.
 123. Tekin N, Öztürk K, Baran T, Kerimoğlu B, Tarhan M, Menteş A. Cytotoxic and apoptotic activities of novel Pd (II) complexes against human leukemia cell lines in vitro. *Journal of Macromolecular Science, Part A.* 2017;54(5):263-70.
 124. Joksimović N, Janković N, Petronijević J, Baskić D, Popovic S, Todorović D, Zarić M, Klisurić O, Vraneš M, Tot A, Bugarčić Z. Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with cisplatin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study. *Med Chem.* 2019: 30686264.
 125. Omondi RO, Bellam R, Ojwach SO, Jaganyi D, Fatokun AA. Palladium(II) complexes of tridentate bis(benzazole) ligands: Structural, substitution kinetics, DNA interactions and cytotoxicity studies. *J Inorg Biochem.* 2020 ;210:111156.
 126. Espino J, Fernández-Delgado E, Estirado S, de la Cruz-Martinez F, Villa-Carballar S, Viñuelas-Zahínos E, Luna-Giles F, Pariente JA. Synthesis and structure of a new thiazoline-based palladium(II) complex that promotes cytotoxicity and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):16745.
 127. Ulukaya E, Frame FM, Cevatemre B, Pellacani D, Walker H, Mann VM, Simms MS, Stower MJ, Yilmaz VT, Maitland NJ. Differential cytotoxic activity of a novel palladium-based compound on prostate cell lines, primary prostate epithelial cells and prostate stem cells. *PLoS One.* 2013;8(5):e64278.
 128. Plutín AM, Mocado R, Alvarez A, Ramos R, Castellano EE, Cominetti MR, Graminha AE, Ferreira AG, Batista AA. On the cytotoxic activity of Pd(II) complexes of N,N-disubstituted-N'-acyl thioureas. *J Inorg Biochem.* 2014;134:76-82.
 129. Al-Jibori, S.A., Synthesis, characterization and anti-tumor activity of Pd(II) complexes with 4,5-benzo-3H-1,2-dithiole-3-thione. *Transit Met Chem* 44, 575–83.
 130. Raudenská M, Navrátil J, Gumulec J, Masařík M. Mechanobiology of cancerogenesis. *Klin Onkol.* 2021;34(3):202-10.
 131. Motofei IG. Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Invest.* 2018;36(5):309-17.
 132. Arbour KC, Riely GJ. Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA.* 2019;322(8):764-74.
 133. Ganesh K, Massagué J. Targeting metastatic cancer. *Nat Med.* 2021;27(1):34-44.
 134. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9667.
 135. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395-417.
 136. Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(11):977-88.

137. Rajabi S, Maresca M, Yumashev AV, Choopani R, Hajimehdipoor H. The Most Competent Plant-Derived Natural Products for Targeting Apoptosis in Cancer Therapy. *Biomolecules*. 2021.
138. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):65-80.
139. Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, Memon Z, Ahmed N, Hasnain SN. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? *Cancer Manag Res*. 2018;10:403-16.
140. Rahmani M, Nkwocha J, Hawkins E, Pei X, Parker RE, Kmiecik M, Levenson JD, Sampath D, Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Cotargeting BCL-2 and PI3K Induces BAX-Dependent Mitochondrial Apoptosis in AML Cells. *Cancer Res*. 2018;78(11):3075-86.
141. Dang F, Nie L, Wei W. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2021;28(2):427-38.
142. Recasens A, Munoz L. Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(2):128-41.
143. Mills CC, Kolb EA, Sampson VB. Development of Chemotherapy with Cell-Cycle Inhibitors for Adult and Pediatric Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2018;78(2):320-25.
144. Hauner K, Maisch P, Retz M. Nebenwirkungen der Chemotherapie [Side effects of chemotherapy]. *Urologe A*. 2017;56(4):472-79.
145. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*. 2019;54(2):407-19.
146. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*. 2019;88:102925.
147. Chrzanowska A, Drzewiecka-Antonik A, Dobrzyńska K, Stefańska J, Pietrzyk P, Struga M, Bielenica A. The Cytotoxic Effect of Copper (II) Complexes with Halogenated 1,3-Disubstituted Arylthioureas on Cancer and Bacterial Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11415.
148. Shehadi IA, Delmani FA, Jaber AM, Hammad H, AlDamen MA, Al-Qawasmeh RA, Khanfar MA. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Metal Adamantyl 2-Pyridylhydrazone Complexes. *Molecules*. 2020 May 29;25(11):2530.
149. Stevanović N, Mazzeo PP, Bacchi A, Matić IZ, Đorđić Crnogorac M, Stanojković T, Vujčić M, Novaković I, Radanović D, Šumar-Ristović M, Sladić D, Čobeljić B, Anđelković K. Synthesis, characterization, antimicrobial and cytotoxic activity and DNA-binding properties of d-metal complexes with hydrazones of Girard's T and P reagents. *J Biol Inorg Chem*. 2021;26(8):863-80.
150. Mbugua SN, Sibuyi NRS, Njenga LW, Odhiambo RA, Wandiga SO, Meyer M, Lalancette RA, Onani MO. New Palladium(II) and Platinum(II) Complexes Based on Pyrrole Schiff Bases: Synthesis, Characterization, X-ray Structure, and Anticancer Activity. *ACS Omega*. 2020;5(25):14942-54.
151. Valentini A, Conforti F, Crispini A, De Martino A, Condello R, Stellitano C, Rotilio G, Ghedini M, Federici G, Bernardini S, Pucci D. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells. *J Med Chem*. 2009 22;52(2):484-91.
152. Oliveira KM, Peterson EJ, Carroccia MC, Cominetti MR, Deflon VM, Farrell NP, Batista AA, Correa RS. Ru(II)-Naphthoquinone complexes with high selectivity for triple-negative breast cancer. *Dalton Trans*. 2020 ;49(45):16193-203.
153. da Silva MM, de Camargo MS, Correa RS, Castelli S, De Grandis RA, Takarada JE, Varanda EA, Castellano EE, Deflon VM, Cominetti MR, Desideri A, Batista

- AA . Non-mutagenic Ru(ii) complexes: cytotoxicity, topoisomerase IB inhibition, DNA and HSA binding. *Dalton Trans.* 2019;48(39):14885-97.
154. Villarreal W, Colina-Vegas L, Visbal G, Corona O, Corrêa RS, Ellena J, Cominetti MR, Batista AA, Navarro M. Copper(I)-Phosphine Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. *Inorg Chem.* 2017;56(7):3781-93.
155. Rocha FV, Farias RL, Lima MA, Batista VS, Nascimento-Júnior NM, Garrido SS, Leopoldino AM, Goto RN, Oliveira AB, Beck J, Landvogt C, Mauro AE, Netto AVG. Computational studies, design and synthesis of Pd(II)-based complexes: Allosteric inhibitors of the Human Topoisomerase-II α . *J Inorg Biochem.* 2019;199:110725.
156. Hernández W, Wilfredo et al. "Synthesis and Characterization of New Palladium(II) Thiosemicarbazone Complexes and Their Cytotoxic Activity against Various Human Tumor Cell Lines." *Bioinorganic chemistry and applications.* doi:10.1155/2013/524701
157. Carreira M, Calvo-Sanjuán R, Sanaú M, Marzo I, Contel M. Organometallic Palladium Complexes with a Water-Soluble Iminophosphorane Ligand as Potential Anticancer Agents. *Organometallics.* 2012;31(16):5772-81.
158. Svoboda, Jan, et al. "Trans-palladium complexes with 1-adamantanamine and various halide ions: Synthesis, characterization, DNA and protein binding and in vitro cytotoxicity." *Polyhedron* 209. 2021: 115458.
159. Ari F, Cevatemre B, Armutak EI, Aztopal N, Yilmaz VT, Ulukaya E. Apoptosis-inducing effect of a palladium(II) saccharinate complex of terpyridine on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(17):4948-54.
160. Hadizadeh S, Najafzadeh N, Mazani M, Amani M, Mansouri-Torshizi H, Niapour A. Cytotoxic Effects of Newly Synthesized Palladium(II) Complexes of Diethyldithiocarbamate on Gastrointestinal Cancer Cell Lines. *Biochem Res Int.* 2014:813457.
161. Li Y, Gu Z, Zhang C, Li S, Zhang L, Zhou G, Wang S, Zhang J. Synthesis, characterization and ROS-mediated antitumor effects of palladium(II) complexes of curcuminoids. *Eur J Med Chem.* 2018;144:662-71.
162. Bjelogrić SK, Todorović TR, Kojić M, Senćanski M, Nikolić M, Višnjevac A, Araškov J, Miljković M, Muller CD, Filipović NR. Pd(II) complexes with N-heteroaromatic hydrazone ligands: Anticancer activity, in silico and experimental target identification. *J Inorg Biochem.* 2019 Oct;199:110758.

БИОГРАФИЈА

Дејан Симић, рођен је 27. априла 1975. године у Врању. Основно образовање завршио је у родном граду, а затим и Гимназију “Бора Станковић” у Врању. Након завршетка средње школе, 1994. године уписао је Медицински факултет, Универзитета у Београду, и на истом дипломирао 31.05.2002. године са просечном оценом 9,03 и тиме стекао звање – доктор медицине. Након обављеног лекарског стажа и положеног стручног испита у јуну 2003. године ступа у професионалну војну службу и ради као лекар опште праксе у Војномедицинском центру хитне помоћи у Београду. Период од јуна до децембра 2006. године провео је у Демократској републици Конго, као лекар на пословима евакуације пацијената ваздушним путем, у оквиру мировне мисије Уједињених нација. Од маја 2007. године налази се на специјализацији из урологије у Војномедицинској академији. 21.06.2012. године положио је специјалистички испит са одличном оценом, након чега ради као лекар специјалиста, уролог у Клиници за урологију, Војномедицинске академије. У октобру 2013. године уписао је Докторске академске студије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

2011. године завршио је Европску школу урологије “EUREP” у организацији Европског удружења уролога, у Прагу. У периоду од 27.08. до 16.09.2018. године боравио је у болници “Beijing Friendship Hospital”, у Пекингу, где је завршио курс минимално инвазивних уролошких оперативних техника.

Члан је Лекарске коморе Србије, Српског лекарског друштва, Удружења уролога Србије, Европског удружења уролога (EAU) и Ендоуролошког друштва.

Ожењен је, отац троје деце.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Simić D**, Zarić M, Nikolić I, Živković-Zarić R, Čanović P, Kočović A, Radojević I, Raković I, Jovičić Milić S, Petrović Đ, Stojković D, Vuković N, Kačániová M, Vukić M, Jevtić V. Newly synthesized palladium(II) complexes with aminothiazole derivatives: in vitro study of antimicrobial activity and antitumor activity on the human prostate cancer cell line. *Dalton Trans.* 2022;51(3):1191-1205. **M21**
2. Milošević R, Milović N, Aleksić P, Lazić M, Cerović S, Prelević R, Spasić A, **Simić D**, Kovačević B. The clinical course of non-muscle invasive bladder cancer after transurethral resection of the tumor with or without subsequent intravesical application of bacillus Calmette-Guérin: The influence of patients gender and age. *Vojnosanit Pregl.* 2015;72(7):596-601. **M23**
3. Prelević R, Stojadinović MM, **Simić D**, Spasić A, Petrović N. Scoring system development for prediction of extravesical bladder cancer. *Vojnosanit Pregl.* 2014;71(9):851-7. **M23**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

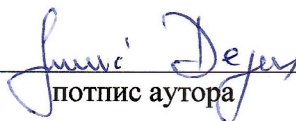
Испитивање цитотоксичности комплекса паладијума(II) са дериватима тиазола као лигандима на ћелијама тумора простате in vitro

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође *потврђујем*:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 2022. године,


потпис аутора

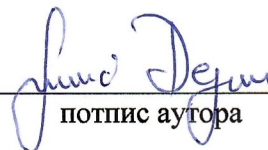
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

Испитивање цитотоксичности комплекса паладијума(II) са дериватима тиазола као
лигандима на ћелијама тумора простате in vitro

истоветне.

У Крагујевцу, 2022. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Дејан Симић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Испитивање цитотоксичности комплекса паладијума(II) са дериватима тиазола као лигандима на ћелијама тумора простате in vitro

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

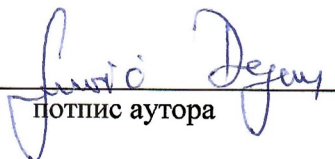
не дозвољавам¹

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, 2022. 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/>