



ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

**Испитивање цитотоксичности комплекса злата и платине на
ћелијским линијама аденокарцинома плућа *in vitro* и *in vivo***

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КАНДИДАТ

МИЛОШ АРСЕНИЈЕВИЋ

МЕНТОР

ДОЦ. ДР ВЛАДИСЛАВ ВОЛАРЕВИЋ

Ова дисертација представља резултат залагања и активности многих људи који су учествовали у њеној реализацији и коначном обликовању.

Велику захвалност дугујем свом ментору, доценту др Владиславу Воларевићу на бескрајном стрпљењу, научном усмеравању и истрајности у комуникацији током израде ове дисертације.

Посебну захвалност желим да упутим и доценту др Марији Миловановић која ми је, уз огромно стрпљење, дала велике савете и обучила ме за самостални рад у имунолошкој лабораторији током практичног дела рада.

Такође, желео бих да се захвалим професору Живадину Д. Буграчићу, на саветима и безрезервној подршци, као и његовом целокупном тиму са Катедре за неорганску хемију, Факултета природних наука у Крагујевцу.

Свим колегама са Катедре за микробиологију и имунологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу дугујем велику захвалност што су ми саветима током практичног рада несебично давали савете и надам да ће се наша сарадња наставити и у будућности.

Својим колегама са Клинике за општу и грудну хирургију, а посебно колегама са Одељења грудне хирургије, бих желео да упутим бескрајну захвалност за разумевање и стрпљење које су имали за мене током израде ове дисертације.

Породици захваљујем на стрпљењу које су имали са мном током писања ове дисертације.

Својој породици

САДРЖАЈ

1. УВОД	5
1.1. Молекуларна основа канцерогенезе плућа	5
1.1.1. Протоонкогени и тумор супресорни гени	5
1.1.2. Механизми унутарћелијске сигнализације	8
1.1.2.1. Ras сигнални пут	13
1.1.2.2. Jak-STAT сигнални пут	21
1.1.2.3. Wnt- β катенински пут	23
1.1.2.4. Сигнални пут који активира нуклеарни фактор κ B	25
1.1.2.5. Notch сигнални пут	26
1.1.2.6. Hedgehog сигнални пут	28
1.1.2.7. TGF- β сигнални пут	29
1.1.2.8. Улога интегрина у унутарћелијској сигнализацији	31
1.1.2.9. Улога „G-протеин везаних рецептора“ у унутарћелијској сигнализацији	32
1.1.3. Регулација ћелијског циклуса	34
1.1.4. Молекуларна основа дисеминације тумора	38
1.1.5. Матичне ћелије тумора	42
1.1.6. Апоптоза	44
1.2. Клинички аспект карцинома плућа	46
1.2.1 Епидемиолошки подаци и етиопатогенеза карцинома плућа	46
1.2.2.1. Не-ситно-ћелијски карциноми плућа(non-small cell lung cancer, NSCLC)	49
1.2.2.1.1. Планоцелуларни карцином плућа	49
1.2.2.1.2. Аденокарцином плућа	49

1.2.2.1.3. Крупно-ћелијски карцином плућа.....	50
1.2.2.2. Ситно-ћелијски карцином плућа(small cell lung cancer, SCLC)	50
1.2.2.3. ТНМ класификација тумора плућа	51
1.2.3. Комплекси платине и злата као потенцијално нови терапеутици за лечење карцинома плућа	54
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	57
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	58
3.1. ЋЕЛИЈСКЕ ЛИНИЈЕ.....	58
3.1.1. Хумане мезенхималне матичне ћелије	58
3.1.2. Ћелијска линија хуманог аденокарцинома плућа.....	59
3.1.3. Ћелијска линија мишијег карцинома плућа.....	59
3.2. СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ И ЗЛАТА.....	60
3.2.1. Синтеза динуклеарних комплекса платине (II).....	60
3.2.1.1. Синтеза комплекса <i>trans</i> -[PtCl(NH ₃) ₂ (DMF)](ClO ₄)	60
3.2.1.2. Синтеза комплекса [{ <i>trans</i> -PtCl(NH ₃) ₂ } ₂ (μ -пиразин)](ClO ₄) ₂ (Pt1)	60
3.2.1.3. Синтеза комплекса [{ <i>trans</i> -PtCl(NH ₃) ₂ } ₂ (μ -4,4'-бипиридин)](ClO ₄) ₂ · DMF (Pt2) ..	61
3.2.1.4. Синтеза комплекса [{ <i>trans</i> -PtCl(NH ₃) ₂ } ₂ (μ -1,2- <i>bis</i> (4-пиридил) етан)](ClO ₄) ₂ (Pt3) 61	
3.2.2. Синтеза комплекса платине (IV)	62
3.2.2.1. Синтеза комплекса [Pt(bipy)Cl ₂].....	62
3.2.2.2. Синтеза комплекса [Pt(dach)Cl ₂]	62
3.2.2.3. Синтеза комплекса [Pt(bipy)Cl ₄].....	62
3.2.2.4. Синтеза комплекса [Pt(dach)Cl ₄]	63
3.2.3. Синтеза комплекса злата	63
3.2.3.1. Синтеза [Au(dach)Cl ₂]Cl комплекса	63
3.2.3.2. Синтеза [Au(SMC)Cl ₂] комплекса	64

3.3. Методе за испитивање цитотоксичних ефеката.....	64
3.3.1. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) тест	65
3.3.2. LDH (лактат дехидрогеназа) тест	67
3.3.3. Тест за детекцију апоптозе (AnnexinV/PI).....	70
3.4. Методе за испитивање антитуморске активности комплекса <i>in vivo</i>	70
3.4.1. Лабораторијске животиње	70
3.4.2. Индукција експерименталних метастаза	71
3.4.3. Патохистолошка анализа метастаза	72
3.4.4. Фиксација и дехидратација поступком смрзавања ткива	72
3.4.5. Бојење хематоксилином и еозином (H&E).....	73
3.4.6. Верификација броја и величине метастатских колонија.....	73
3.4.7. Изолација спленоцита	74
3.4.8. Проточна цитофлуорометријска анализа популација мононуклеарних ћелија слезине	74
3.4.8.1. Бојење мембранских маркера	75
3.4.8.2. Статистичка обрада података	76
4. РЕЗУЛТАТИ.....	77
4.1. Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијску линију хуманог карцинома плућа A549 <i>in vitro</i>	77
4.1.1. Резултати МТТ теста	77
4.1.2. Резултати LDH теста	83
4.1.3. Сви испитивани комплекси злата и платине индукују апоптотску смрт ћелијске линије хуманог карцинома плућа A549	85
4.2. Комплекси платине су цитотоксичнији од цисплатине за ћелијску линију мишјег карцинома плућа LLC1 <i>in vitro</i>	87

4.2.1. Најслабији цитотоксички ефекат на LLC1 ћелије испољава TS3 мерено МТТ тестом	87
4.2.2. Резултати LDH теста	89
4.2.3. Резултати теста апоптозе.....	89
4.3.Истраживање антитуморске активности комплекса <i>in vivo</i>	91
5. ДИСКУСИЈА.....	100
5.1. Сви испитивани комплекси злата имају снажну анти-туморску активност индукујући апоптотску смрт ћелија хуманог карцинома плућа.....	100
5.2. Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијске линије хуманог и мишијег карцинома плућа <i>in vitro</i>	102
5.3. PtEn комплекс има слабу анти-туморску активност <i>in vivo</i> , али значајно мења целуларни састав слезине мишева који у примили LLC1 туморске ћелије.....	105
6. ЗАКЉУЧЦИ	108
7. Литература.....	109

1. УВОД

За испитивање цитотоксичности нових анти-туморских лекова, неопходно је да се разумеју механизми који регулишу канцерогенезу. Због тога у уводном делу ове дисертације најпре ћемо описати молекулску основу канцерогенезе плућа, објаснити унутарћелијске сигналне путеве укључене у канцерогенезу, регулацију ћелијског циклуса, апоптозу и метастазирање, а затим ћемо описати класификацију тумора плућа и представити у литератури, до данас, познате резултате који говоре о потенцијалним анти-туморским ефектима комплекса злата и платине.

1.1. Молекулска основа канцерогенезе плућа

Настанак карцинома плућа је вишестепен процес током којег се нормалне епителне ћелије плућа генетички и фенотипски прогресивно трансформишу стичући способност неконтролисане деобе. Током неконтролисане деобе, ћелије канцера постају аутономне, што се често означава као „асоцијално понашање” туморских ћелија.(1)

1.1.1. Протоонкогени и тумор супресорни гени

Данас се сматра да је за развој тумора (канцерогенезу) потребно неколико генетских промена, наследних или стечених, које обезбеђују предност у расту и развоју.(2) Иницијалне генетске промене, мутације специфичних онкогена и инактивације тумор супресорских гена обезбеђују туморским ћелијама пролиферативну предност. Свака следећа генетска промена може да створи „напреднији” фенотип, кога карактеришу аутономија раста, неосетљивост на инхибиторне сигнале, “избегавање” апоптозе, стална ангиогенеза, неограничен репликативни потенцијал, способност инвазивности и метастазирања. Овакве ћелије постају прогенитори клоналне популације, која доминира туморском масом.(2,3)

Дакле, неконтролисана деоба ћелије је последица дисфункције протоонкогена и/или тумор супресорних гена (антионкогена), који контролишу функцију протоонкогена

и делују као балансери у процесу мутације протоонкогена у онкоген. Нарушавање хомеостазе између ћелијског раста и програмиране ћелијске смрти (апоптозе) је често последица неке од мутација протоонкогена или тумор-супресорних гена (4). Промене у експресији ових гена условљене су физичким, хемијским и биолошким агенсима који у кумулативном дејству узрокују њихово оштећење, односно узрокују настанак мутација у њима. Активирани онкогени који у диферентованој ћелији могу изазвати малигну трансформацију настају конверзијом протоонкогена, који су у нормалној, здравој ћелији укључени у процесе регулације ћелијског циклуса (5). До данас је откривено око стотину потенцијалних онкогена, као и дванаест тумор-супресорних гена међу којима је најпотентнији и најбоље проучен p53, који се активира у условима оштећења ДНК, хипоксије, као и перманентне митогене стимулације. Смањена функција p53 тумор-супресорног гена корелира са бржом пролиферацијом и настајањем спонтаних генетских абнормалности због чега је овај ген и назван чуваром генома (6).

Експресијом p53 гена настаје p53 протеин. Тумор супресорни протеин p53 је који је добио назив по томе што му молекуларна маса износи 53 kDa. У нормалним околностима ниво p53 је регулисан захваљујући Mdm2 протеину који га везује и носи из једра у цитоплазму. Mdm2 протеин је убиквитин лигаза што значи да маркира p53 и шаље га на разградњу у протеозом. На тај начин се одржава низак ниво p53. Међутим, услед стреса, радијације, оксидативног стреса, неправилности у ћелијском циклусу или хипоксије долази до активације p53. Активирани p53 се везује за ДНК и узрокује експресију одређених гена, укључујући microRNA и ген који кодира p21 из cip/kip фамилије. Активирани p21 се везује за комплекс циклина и циклин зависне киназе у G1 и S фази, онемогућавајући прогресију ћелијског циклуса.(6,7) Долази или до апоптозе и елиминације ћелије, или репарације оштећења на молекулу ДНК а потом наставка циклуса. У физиолошким условима p53 ген подстиче експресију специфичног p16 гена, чији производи интензивирајући оксидативни стрес, изазивају промене на мембрани митохондрија и једра, што резултира активацијом каспаза, и иницијацијом апоптозе. Дисрегулација активности p53 гена ћелију уводи у неконтролисану и континуирану пролиферацију .(7,8)

Ретиноблатома протеин (pRb) је уз p53, један од најважнијих тумор супресорских протеина. Једна од функција pRb је да спречи прекомеран раст ћелије тако што доводи до заустављања ћелијског циклуса. Поред тога учествује у активацији ензима заслужних за ремоделацију хроматина, као што су метилазе и ацетилазе.(8) Ретиноблатома протеин припада фамилији тзв. џепних протеина (енгл. pocket protein) који, као што им и назив каже, имају џеп за функционално везивање за друге протеине. Дакле, pRb превенира репликацију оштећене ДНК тако што инхибира E2F транскрипциони фактор који би иначе доводио до прогресије ћелијског циклуса, односно преласка у S фазу.(8,9)

За процес канцерогенезе важна је и дисфункција тзв. раних гена. Ови непосредни рани гени кодирају низ протеина. Неки од њих су транскрипциони фактори, који директно утичу на експресију гена. У ову групу спадају *myc*, *fos* и *jun* гени, који су првобитно идентификовани у трансформишућим ретровирусима.(10,11)

Ниво *myc* mRNA расте након митогене стимулације, док пада након престанка дејства митогена.(12) Активност *Myc* протеина, као сигналног протеина зависи од промена његове концентрације унутар ћелијског једра, што је у супротности са цитоплазматским сигналним протеинима, као што су *Ras* и *Src*. Ови цитоплазматски протеини одговарају на митогени сигнал променом структуре, а не повећањем концентрације.(13) Ова разлика се запажа када нормалан *myc*, *gas* и *src* ген постану онкогени. Тада ниво *Myc* протеина постаје нерегулисан; уместо нормалног одговора на физиолошки сигнал, он бива конститутивно експримиран. Ниво *Ras* и *Src* протеина не мора бити промењен, али се уочавају промене у њиховој структури. (14)

Остали непосредни рани гени кодирају протеине који се секретују у екстраћелијски простор као цитокини, или пак помажу у изградњи цитоскелета ћелије. У ову групу спадају гени за тропомиозин, фибронектин и актин.(15,16)

У канцерогенези важну улогу имају и фактори раста. Фактори раста узрокују раст и деобу ћелија везујући се за своје рецепторе на површини ћелије.(17) Поред рецептора за факторе раста на површини ћелије, у самој ћелији је присутан и низ других протеина који брзо преносе митогени сигнал са рецептора на површини ћелије, до транскрипционих фактора у једру.(18) Промене у структури ових протеина, конфигурацији и интраћелијској локализацији игра доминантну улогу у њиховој активацији убрзо након стимулације

тирозин киназних рецептора факторима раста. Откривено је да неки фактори раста индукују мотилитет ћелија, што се види кретањем преко доње површине Петријеве шоље. Други фактори раста врше реорганизацију актинских влакана чиме помажу изградњу цитоскелета. Многи фактори раста обезбеђују сигнал за преживљавање ћелија, штитећи их на тај начин од апоптозе.(19) Хиперекспресија и/или мутација рецептора епидермалног фактора раста (EGF) откривена је у многим канцерским ћелијама епителног порекла. Овај фактор раста поседује рецептор тирозин киназу чијом активацијом се активира Ras-МАРК сигнална каскада.(20) Недавно је показано да је активација MAP киназног пута одговорна за неоангиогенезу тумора плућа као предуслов његовог раста и метастазирања (21). Уз то, алтерација K-ras и c-mos онкопротеина, који представљају окидаче за хиперекспресију MAPK, у директној је корелацији са степеном ангиогенезе тумора као и са синтезом васкуларног ендотелијалног фактора раста (VEGF) (22).

1.1.2. Механизми унутарћелијске сигнализације

Ћелије карцинома неконтролисано пролиферишу, што значи да имају другачији начин програмирања раста и деобе, у односу на нормалну ћелију. Једна ћелија може да експримира 20000 или чак више различитих протеина од којих су многи активно укључени у процес унутарћелијске сигнализације. Ови протеини функционишу у линеарној сигналној каскади и препознају само оне сигнале које примају од протеина изнад, прослеђујући га на протеине испод у линеарном сигналном путу. Неки сигнални путеви се преносе директно у једро, где мењају генску експресију, док други делују у цитоплазми, на синтезу протеина и организацију структуре цитоскелета.(23) Протеини, компоненте сигналних путева представљају високо конзервиране протеине. Биохемијским и генетским испитивањем различитих животињских врста, створена је слика линеарног сигналног пута (схема 1).

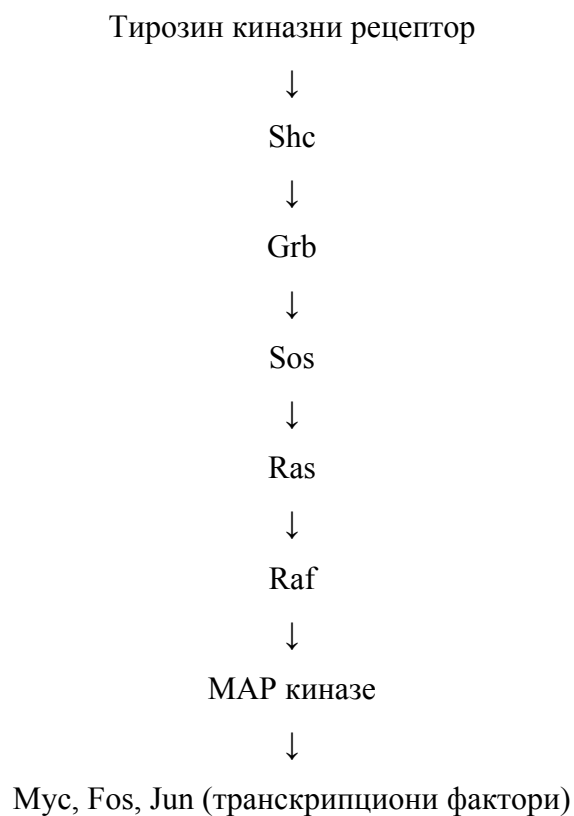
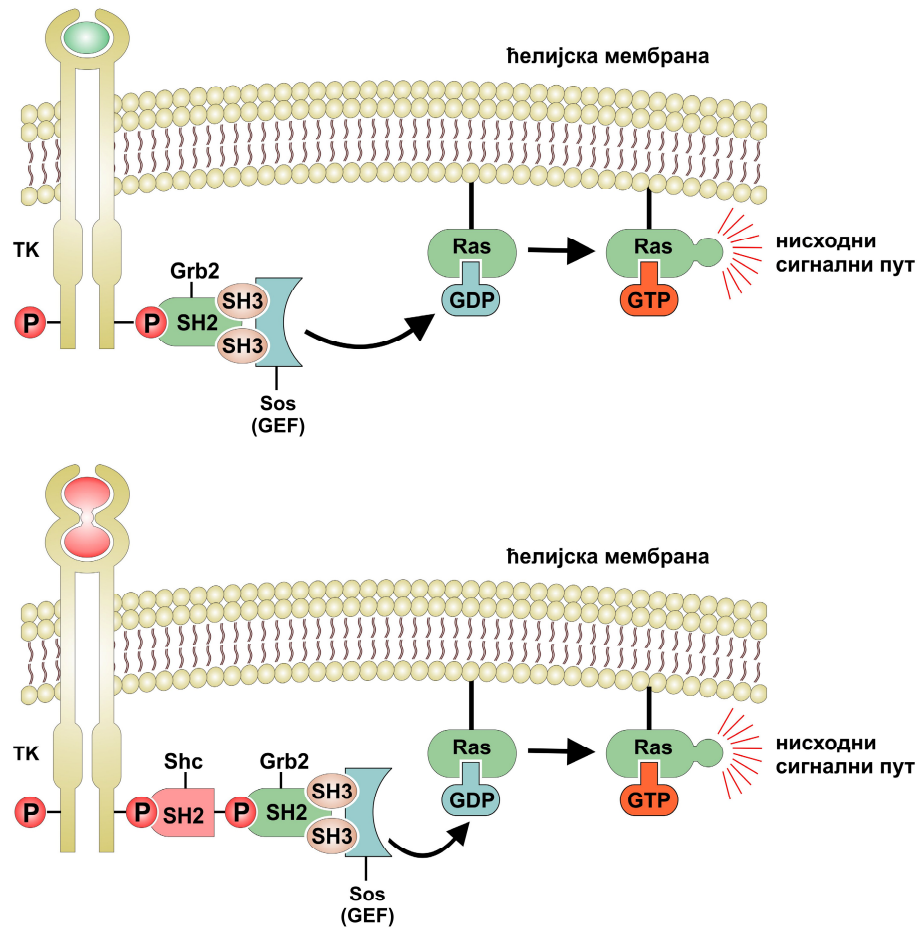


Схема 1: сигнална каскада

Различити молекулски механизми су одговорни за промене у сигналним путевима укљученим у раст ћелије и апоптозу. Сигнал се кроз цитоплазму преноси дуж ланца протеина хемијском реакцијом, фосфорилацијом, захваљујући протеин киназама. Оне преносе фосфатну групу на одређену аминокиселину циљног протеина, чиме га активирају. Дакле, протеин киназе фосфорилацијом мењају структуру (тродимензионалну конформацију) циљних протеина, и сваки од њих постаје активан и способан да преноси сигнал корак ниже, тј.на протеин испод у одговарајућем линеарном сигналном ланцу.(23,24) Постоји више интрацелуларних протеин-киназних путева за пренос сигнала са мембранског рецептора до једра, при чему мутација гена за било који од протеина укључених у унутарћелијску сигнализацију за последицу може имати неконтролисану и континуирану стимулацију ћелије и појаву тумора (24). Медијатори сигналног пута су и

тзв. адаптерски молекули: Shc и Grb2 (слика 1). Они формирају мостове између рецептора фактора раста и Sos протеина. (25)



Слика 1. Унутарћелијска сигнализација посредована адаптерским молекулима (Grb2 и Shc)

Активирани транскрипциони фактори (Myc, Fos, Jun) модулирају експресију гена одговорних за ћелијску деобу и пролиферацију.(11)

Алтернативни модел преноса сигнала унутар ћелије, подразумева да се након везивања фактора раста за рецептор, фосфорилише његов цитоплазматски домен, који онда мења локацију нисходних учесника сигналног пута без обавезне промене њихове активности. Нова локација у цитоплазми, омогућава овим протеинима да наставе емисију сигнала. Ова релокализација протеина, изгледа представља важнији модел у унутарћелијској сигнализацији и канцерогенези (26), а посебан значај у овом процесу имају секвенце аминокиселина, назване Src хомологи домени 1, 2 и 3 (SH1, SH2, SH3) најпре откривене у Src протеинима.(26,27)

SH1 домен је каталитички домен Src рецептора, а присутан и у другим тирозин киназним рецепторима, као и у другим нерцепторским тирозин киназама сличне конфигурације указујући на заједничко еволутивно порекло свих киназа. (27)

SH2 домен, присутан у Src рецептору и другим протеинима, је релативно мали структурни домен од око 100 аминокиселинских остатака. За овај домен се везује кратка олигопептидна секвенца која садржи и фосфорилисани тирозин и специфичну олигопептидну секвенцу дугу 3-6 аминокиселинских остатака која везује фосфотирозин на С терминалном крају.(27) Постоје десетине различитих SH2 домена, од којих сваки носи различите протеине и има афинитет за одређене олигопептидне секвенце које садрже фосфотирозин и на тај начин функционишу као његов лиганд. Процењено је да људски геном кодира најмање 120 различитих SH2 домена. Овај домен омогућава протеинима да буду локализовани на тачно одређено место у ћелији. Неки протеини са овим доменом немају ензимску активност, док други носе каталитичко место потпуно другачије од тирозин киназне активности. Као последица лиганд индуковане трансфосфорилације рецепторског молекула, приказате се карактеристичан низ фосфотирозинских остатака на њиховом цитоплазматском домену. Јединствени низ фосфотирозинских остатака на цитоплазматском домену одређен је његовом аминокиселинском секвенцом. Фосфотирозини се спајају са цитоплазматским протеинима који имају SH2 домен и који су нормално присутни у цитосолу и стога се слободно крећу са једне на другу локацију унутар цитоплазме. Последица везивања лиганда за рецептор фактора раста је укрштање

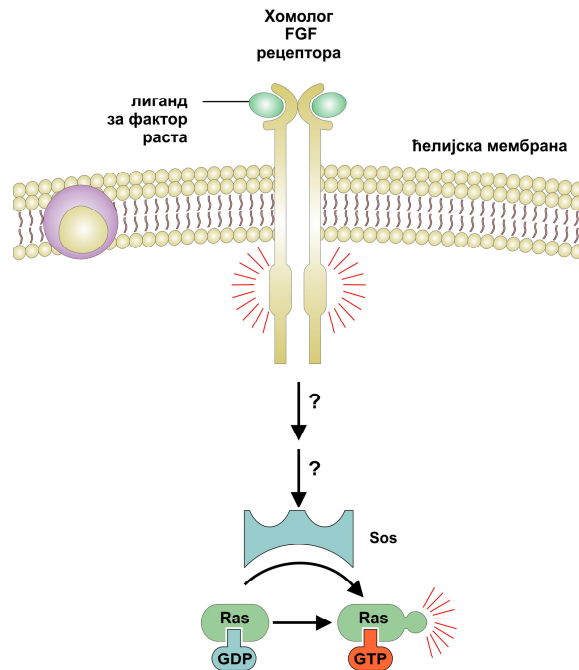
са специфичним сетом протеина који садрже SH2 домен и који бивају привучени фосфотирозинима. Нпр. лигандом активиран PDGF рецептор, привлачи Src, PI3K, Ras-GAP, SHP2 и PLC-7. Сваки од ових протеина носи најмање један SH2 домен, и сваки од њих се окупља око PDGF рецептора, тј. његовог цитоплазматског домена и кратког сегмента у средини овог киназног домена. Једном везани за PDGF рецептор, неки од ових протеина који садрже SH2 домен могу постати субстрати за фосфорилацију тирозина коју врши PDGF рецепторска киназа.(28) Неки пак протеини служе као мостови у овим мултипротеинским комплексима и привлаче друге протеине. Сваки од ових удружених протеина контролише нисходну сигналну каскаду, а свака од њих заузврат утиче на различите аспекте понашања ћелије. Поставши везани за рецептор, протеини који садрже SH2 домен постају спремни да активирају своју одговарајућу нисходну каскаду. Неки од протеина који носе SH2 домен функционишу тако што активирају механизам негативне повратне спреге и гасе рецепторску сигнализацију. Цитоплазматски домен тирозин киназног рецептора налази се на унутрашњој страни плазма мембране, па протеини који садрже SH2 домен бивају привучени рецептором у непосредну близину плазма мембране, а тиме и близу других молекула који су већ везани за плазма мембрану, што им омогућава да интерреагују са протеинима и фосфолипидима плазма мембране, генеришући на тај начин различите биохемијске сигнале који се даље преносе у ћелију. Нпр. након што се Ras-GAP протеин веже за фосфорилисани рецептор, позиционира се у близину Ras протеина. То омогућава интеракцију Ras-GAP са суседним Ras молекулом, стимулишући га да хидролизује везани GTP, и преводeћи га тако из активног у инактивно стање сигнализације. Слично, када фосфатидил-инозитол 3-киназа (PI3K) буде везана у близини плазма мембране може да фосфорилише инозитол. Још један пример унутарћелијске сигнализације је посредован активношћу фосфолипазе C- γ (PLC- γ). Када се нађе у близини плазма мембране, везана за рецептор, PLC- γ разлаже мембрански фосфолипид: фосфатидил—инозитол-4,5-дифосфат (PIP2), у два продукта од којих сваки има сигналну моћ: инозитол-3 фосфат и диацил глицерол (IP3 и DAG). (29)

SH3 домен, трећа секвенца присутна у Src, специфично се везује за секвенце у одговарајућим протеинима које су богате пролином, то значи да те пролином богате секвенце служе као лиганд за SH3 домен.(28) Мала подгрупа SH3 домена препознаје

лиганде различитих структура. Анализом људског генома откривено је 253 различитих SH3 домена, од којих је сваки део већег протеина. Сваки од SH2 и SH3 домена је способан да препозна и веже специфичне секвенце присутне у одговарајућем нисходном молекулу сигналног пута. Неки од ових домена препознају и везују фосфосерин или фосфотreonин одговарајућих протеина, док други везују фосфорилисане форме неких мембранских липида. Други специјализовани домен, који се зове РТВ, је способан као и SH2 домен, да препозна и веже фосфотирозинске остатке, али на N-терминалном крају.(30)

1.1.2.1. Ras сигнални пут

Ras протеин представља један од најважнијих протеина у унутарћелијској сигнализацији. Клонирањем и секвенционирањем *sevenless* гена, који је пронађен да учествује у развоју ока винске мушице, доказано је да кодира протеин који има карактеристике тирозин-киназног рецептора (хомолог FGF рецептору у ћелијама сисара).(31) Даљим генетским испитивањем откривен је ген чији продукт функционише нисходно од *Sevenless* у линеарном сигналном путу, и назива се *son of sevenless* или једноставно *sos* ген (слика 2). Детаљним испитивањем *Sos* протеина доказано је да припада G протеинима, као и Ras протеин. Он је прво гуанин-нуклеотидни фактор размене (GEF), који омогућава G протеинима да отпусте везани GDP, и омогући везивање GTP-а; последица тога је активација G протеина. (32)



Слика 2. Sos протеин

Адаптерски молекул Grb2 садржи два SH3 домена и један SH2 домен. SH3 домен има афинитет за две различите пролином богате секвенце Sos-а, док се SH2 домен спаја са фосфотирозином на С терминалном крају многих активираних рецептора фактора раста. Детаљном структуром Grb2 и сличних протеина, нпр. Crk, указује на то да они не носе друге функционалне домене осим SH2 и SH3. Ови адаптерски протеини представљају мостове којима повезују протеине једне са другима у унутарћелијској сигнализацији. (33)

Једном када се Sos преко Grb2 или преко Grb2 и Shc повеже са рецептором, налази се близу Ras протеина, присутног уз унутрашњу страну плазма мембране. Sos тада директно комуницира са Ras протеином, који онда отпушта GDP, а везује GTP. Ова нуклеотидна размена активира Ras протеинску сигнализацију (схема 2).

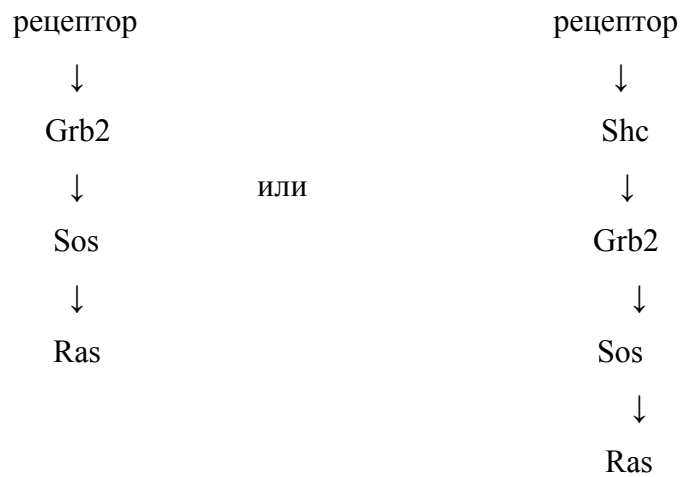


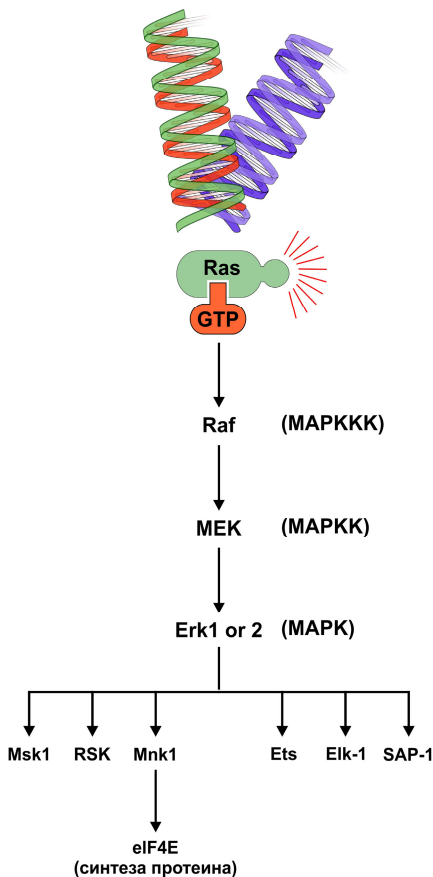
Схема 2: Sos-Ras сигнални пут

Sos-Ras сигнални пут је само један од сигналних путева који се покреће из активираниог рецептора фактора раста. Бројни одговори ћелије на екстраћелијску сигнализацију насталу након везивања фактора раста могу се објаснити чињеницом да је рецептор за који се везују у стању да активира специфичну комбинацију нисходних сигналних путева. Абнормална, стална и неконтролисана активација ових сигналних путева уочена је и у ћелијама карцинома плућа.(34)

Постоје 4 форме Ras протеина: H-Ras, N-Ras и два K-Ras и три нисходна сигнална пута која полазе од Ras протеина, а укључена су у канцерогенезу. Активиран Ras протеин интерреагује са неколико алтернативних нисходних сигналних молекула који се називају Ras ефектори, а то су: Raf, PI3Ки Ral-GEF. Сваки од ових ефектора се чврсто везује за ефекторну петљу GTP везане форме Ras протеина, јер имају мали афинитет за GDP (неактивну) форму.(32,35)

Raf киназа је Ras ефектор који је прво откривен. Raf фосфорилише серинске и треонинске остатке протеина. Активација Raf-а Ras-ом зависи од релокализације Raf-а унутар ћелије. Ras протеин је смештен на унутрашњој страни плазма мембране, и када веже GTP његов афинитет за Raf се јако повећава, што омогућава да се Raf чврсто веже за ефекторну петљу Ras-а. На тај начин Raf који се налази у цитозолу, преко Ras-а бива везан за плазма мембрану. Веза Raf-а са Ras-ом је олакшана додатним протеинима који их држе

повезаним. Raf даље наставља да фосфорилише, а тиме и активира друге киназе познате као МЕК; то су „дуал-специфичне киназе“ које фосфорилишу како серин/треонин остатке, тако и тирозинске остатке. МЕК обично фосфорилише две киназе: Erk1 и Erk2 (екстрацелуларна сигнал-регулишућа киназа). Након фосфорилације, а тиме и активације Erk, оне даље фосфорилишу субстрате који регулишу различите ћелијске процесе, укључујући транскрипцију.(36) Ова врста сигналне каскаде назива се MAPK (митоген-активирајућа протеин киназа) сигнални пут. Erk1 и Erk2 се сматрају MAP киназама. Киназе одговорне за фосфорилацију MAPK називају се MAPKK (у овом случају то је МЕК). Киназе одговорне за фосфорилацију MAPKK су MAPKKK, а то је у овом случају Raf (37) (слика 3.).



Слика 3. Ras→Raf→MAP киназни пут

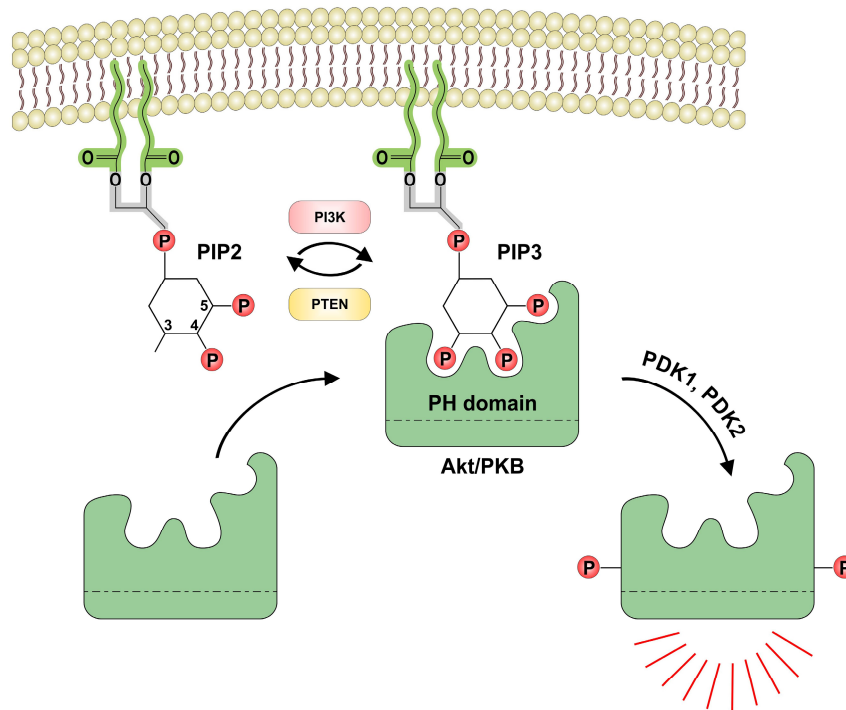
Киназе које формирају ове сигналне каскаде међусобно су повезане протеинима. Протеин KSR1 повезује Raf, MEK и Erk, што омогућава Raf-у да је у близини свог субстрата MEK-а, а MEK-у омогућава да буде у близини свог субстрата, Erk киназе. Фосфорилација једне киназе другом киназом омогућава њену активацију. Нпр., када MEK бива фосфорилисан Raf-ом, постаје активиран у сигнал-емитујућу киназу која фосфорилише и активира Erk киназе. Активиране Erk киназе на дну ове сигналне каскаде, даље фосфорилишу цитоплазматске субстрате, али и транскрипционе факторе у једру (Ets, Elk-1 и SAP-1) директно, или преко активације других киназа које онда фосфорилишу и активирају транскрипционе факторе. Erk киназе фосфорилишу и два протеина који улазе у састав хроматина (HMG-14 и хистон H3) мењајући на тај начин конфигурацију хроматина, што за последицу олакшава транскрипцију. Mnk1 киназа, цитоплазматски субстрат Erk1 и Erk2, фосфорилише фактор иницијације транслације eIF4E, што активира механизам синтезе протеина. Једном када Erk фосфорилише транскрипциони фактор Ets, он наставља да стимулише експресију разних гена регулатора раста: хепарин везујући EGF (HВ-EGF), циклин D1, Fos и p21. Уз то, Raf→MEK→Erk сигнални пут индукује гене који кодирају Fos и Jun транскрипционе факторе. Једном синтетисани, ови протеини чине активни фактор AP1, који је хетеродимерни транскрипциони фактор активан у ћелијама које пролиферишу, као и у ћелијама тумора. Ras→Raf→MEK→Erk је само један од неколико нисходних сигналних путева активираних GTP везаним Ras протеином.(38) Међутим, Raf је одговоран за већи део трансформишуће моћи Ras протеина. Осим активације гена за промоцију раста, овај сигнални пут, након трансформације Ras протеина у онкопротеин, мења облик ћелије и узрокује губитак контактне инхибиције. У неким карциномима, сигнални пут нисходно од Raf-а, може се активирати и без директног учешћа Ras-а. У приближно 50% хуманих меланома, мутирана форма В-Raf-а, праћена супституцијом одређене аминокиселине, изазива скоро 500 пута повећану киназну активност.(39)

Други важан нисходни ефектор Ras протеина јесте сигнални пут који сузбија апоптозу што је од посебног значаја у канцерогенези. Инозитол је угљено-хидратни молекул растворљив у води. Додавањем фосфатних група добија се фосфоинозитол који се може одвојити од хидрофобног дела фосфолипидног молекула. Овај хидрофилни фосфоинозитол, назван IP3 (инозитол-3-фосфат), може дифундовати далеко од плазма

мембране, и на тај начин делује као интрацелуларни хормон и шаље сигнале из плазма мембране у удаљене делове ћелије. Овакав интрацелуларни преносилац сигнала назива се секундарни гласник. Фосфолипаза С делује на фосфатидил-инозитол-4,5-дифосфат и разлаже га на IP3 и DAG. DAG активира кључне сигналне киназе у ћелији, серин/треонин киназе познате као протеин киназа С (PKC). Фосфоинозитол може остати везан за фосфолипиде плазма мембране и да послужи као место везивања одређених цитосолних протеина. На инозитол групу може деловати више различитих киназа. Фосфатидилинозитол-3 киназа (PI3K) везује фосфатну групу на мембрански фосфатидилинозитол. Иако је откривено неколико различитих PI3K, најважнија је PIP2, она фосфорилише фосфатидил-инозитол-4,5-дифосфат који стиче још једну фосфатну групу и постаје PIP3. За разлику од Ras→Raf→MEK→Erk сигналне каскаде где се фосфорилише протеински субстрат, у фосфатидил-инозитол циклусу PI3K везују фосфате у фосфолипидима. Након активације одређених рецептора одговарајућим лигандом, овај ензим бива привучен захваљујући присуству SH2 домена, у близини плазма мембране, тј. његовог субстрата који је урођен у плазма мембрану и фосфорилише фосфолипиде који садрже инозитол. GTP-активирани Ras такође може да веже PI3K и тиме појача своју функционалну активност. H-Ras протеин може ефикасно да активира PI3K, само када је p85 регулаторна јединица PI3K везана за фосфотирозин лигандом активираног рецептора фактора раста. PI3K може да функционише као директни нисходни ефектор Ras-а. Везивањем PI3K за Ras, он се поставља у близину плазма мембране где се налази његов субстрат. Овај ензим се активира различитим низом сигналних агенаса: PDGF, NGF, IGF-1, интерлеукин-3 и неки интегрини. Фосфорилисани инозитол штрчи кроз плазма мембрану и њега могу препознати и везати се одређени протеини који плутају у цитозолу, и тако везани могу да шаљу одређене сигнале. (40)

Многи цитозолни протеини који су привучени PIP3-ом носе тзв, „плекстрих“ хомологи домен (PH) који има јак афинитет за ову троструко фосфорилисану инозитол групу. Вероватно најважнији протеин који садржи PH домен је серин/треонин киназа Akt, позната и под називом протеин киназа В (PKB). Akt/PKB киназа се преко свог PH домена везује за PIP3 који се протеже из плазма мембране у цитосол (слика 4). Ово везивање доводи до функционалне активације Akt/PKB као киназе. Једном активан, он

фосфорилише низ протеинских субстрата који имају вишеструко дејство на ћелију: помажу у преживљавању ћелије, смањујући могућност апоптозе, стимулишу пролиферацију ћелије, стимулишу раст ћелије, утичу на покретљивост ћелије и ангиогенезу што је од посебног значаја за метастазирање. (41)



Слика 4. Везивање Akt/ПКВ преко PH домена за PIP3

Активација PIP3, а самим тим и Akt/ПКВ је строго контролисана. У фази мировања, у одсуству стимулације фактором раста, интрацелуларни ниво PIP3 је екстремно низак. Након стимулације митогеном, ново PIP3 у ћелији брзо расте. Нормално низак ниво PIP3 и других PI молекула обезбеђују фосфатазе. Најбоље проучена фосфатаза је PTEN која уклања фосфатну групу са положаја 3 PIP3, супротно у односу на PI3K. У ћелијама карцинома најчешће се уочава или хиперактивност PI3K киназе или неактивност PTEN фосфатазе. Фосфорилација коју врши Akt/ПКВ резутира инхибицијом неколико протеина који имају важну улогу у апоптози.(42) Пролиферативна способност ове киназе огледа се у инхибицији појединих протеина који учествују у ћелијском циклусу. Такође изазива промене у протеинима који контролишу синтезу протеина у ћелији. Она преко посредника активира mTOR киназу која фосфорилише и инактивира 4E-BP, потентни инхибитор

транслације, и у исто време фосфорилише и активира p70S6 киназу, која је активатор транслације. Тако се повећава ефикасност транслације mRNA и повећава синтеза протеина што за последицу има пораст волумена ћелије.(42,43)

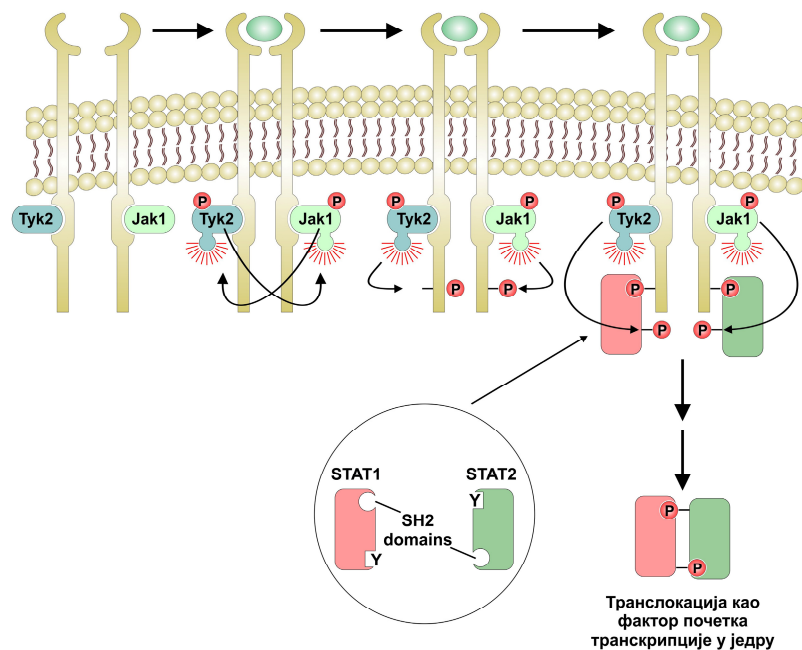
И други цитоплазматски протеини користе свој PH домен за везивање са PIP3, што омогућава њихову функционалну активацију. Међу њима је GEF (фактор размене гуанинских нуклеотида) који је одговоран за активацију различитих малих GTP-аза које припадају фамилији Rho сигналних протеина, која укључује Rho и два сродна протеина: Ras и Cdc42. Rho протеини функционишу на идентичан начин као Ras протеин, односно у активном су облику када је за њиц везан GTP и у неактивном када је за њих везан GDP. Када се једном активира везивањем за PIP3, Rho-GEF делује на исти начин као што Sos делује на Ras, индукује да Rho протеин отпусти GDP, и веже GTP, и тиме се активира. Активирани Rho протеини учествују у реаранжирању цитоскелета и повезаности ћелије са њеном околином, и на тај начин контролишу облик ћелије, њену покретљивост, а када су у питању ћелије карцинома, и инвазивност. Нпр. Cdc42 протеин је укључен у реорганизацију актина цитоскелета ћелије, као и контролу филоподија, док је Ras укључен у формирање ламелиподија, што је уско повезано са инвазијом туморских ћелија и метастазирањем. Сигнални пут који укључује метаболите фосфатидил-инозитола и Akt/PKB је дерегулисан у многим ћелијама карцинома.(44) У узнапредовалим карциномима јајника повећан је ниво једног облика PI3K који је удружен са повећаним степеном пролиферације и инвазивности, као и смањењем апоптозе. У другим туморима: лимфоми, карциноми главе и врата, карциноми дебелог црева, Akt/PKB ензим је прекомерно експримиран и појачано активиран. PI3K је хиперактивиран у скоро 1/3 хуманих карцинома колона због мутације на његовој p100 α каталитичкој субјединици.(45)

Трећи велики ефекторни нисходни пут Ras-а укључује Ras-у сличне протеине Ral-A и Ral-B. Њихова функционална активација (као и код Ras-а) укључује замену GDP-а са GTP-ом. Комуникација између Ras и Ral протеина је посредована Ral-GEF-ом који стимулише Ral протеин да отпусти GDP и веже GTP. Сваки Ral-GEF има џеп за који везује активирани Ras, што онда доводи Ral-GEF у близину плазма мембране, а изазива и конформационе промене. Резултат активације Ral-A и Ral-B протеина је даља нисходна сигнализација. Ral сигнални пут активира два протеина: Sec5 и Eho84, а преко активације

RalBP1 инактивише Cdc42 и Rac. Ral протеин изгледа има кључну улогу способности карциномских ћелија да врше инвазију, односно да метастазирају.(46)

1.1.2.2. Јак-STAT сигнални пут

Осим рецептора који носе ковалентно везан тирозин-киназни домен, постоји и група рецептора која је нековалентним везама повезана са тирозин киназама, тзв. Janus (Јак) киназе. Везивање лиганда за рецепторски молекул прати димеризација рецептора. Јак киназа која је повезан са рецепторским молекулом фосфорилише тирозин у цитоплазматском домену другог рецепторског молекула (слично трансфосфорилацији након активације рецептора везивањем EGF и PDGF). Добијени фосфотирозини привлаче и везују транскрипционе факторе који садрже SH2 домен, преносиоце сигнала и актоваторе транскрипције, тзв. STAT молекуле (енгл.: signal transducers and activators of transcription), које након тога фосфорилише Јак ензим. На овај начин се формирају STAT молекули који садрже и SH2 домен и фосфотирозине. SH2 домен STAT1 молекула специфично се везује за фосфотирозински остатак другог STAT2 молекула. Овако формиран димер STAT-STAT мигрира у једро где функционише као транскрипциони фактор (47) (слика 5).



Слика 5. Јак-STAT сигнални пут

STAT протеини активирају циљне гене који учествују у ћелијској пролиферацији. Ту спадају тус ген, гени за циклине D2 и D3 и ген који кодира јак антиапоптотички протеин Bcl-XL. Поред фосфорилације STAT молекула, Јак може да фосфорилише субстрате који активирају друге митогене путеве, укључујући Ras-МАР киназни пут.(48)

У канцерогенези плућа посебно важну улогу има STAT3 молекула. Реаранжирањем STAT3 протеина увођењем пара цистеинских остатака настаје мутирани STAT3 молекул који се спонтано димеризује формирањем стабилних ковалентних дисулфидних веза. Овај стабилизовани STAT3 димер структурно и функционално имитира димере формиране нормалном фосфорилацијом STAT3 протеина Јак киназом. Уз то, мутирани STAT3 протеин функционише као онкопротеин, конститутивно је активан као транскрипциони фактор.(49) STAT3 може бити конститутивно активан у многим хуманим карциномима. Нпр., у многим меланомима, његова активација се приписује Src протеину, који је такође

конститутивно активан у овим малигним ћелијама. Src протеин је нерецепторска киназа, који фосфорилише и тако активира STAT3 (као и још најмање 4 протеина из фамилије Src). Ово указује на чињеницу да се STAT молекули у цитоплазми могу активирати тирозин киназама које нису Jak киназе. Инхибицијом Src протеина у ћелијама меланома, деактивира се STAT3, који изазива апоптозу. Овако STAT3 обезбеђује преживљавање ћелија карцинома. У већини ћелија карцинома дојке, STAT3 је конститутивно активан, и бива фосфорилисан сарадњом Src и Jak киназа. Као и у ћелијама меланома, и у ћелијама карцинома дојке деактивација STAT3 узрокује инхибицију раста и апоптозу. У скоро свим карцинома глава и врата, STAT3 је конститутивно активан вероватно активацијом EGF рецептора. У многим глиобластомима, активација STAT3 је фаворизирана губитком фосфатазе одговорне за уклањање његовог фосфотирозина. Активација STAT3 такође је присутна и у ћелијама карцинома плућа и желуца. Након доспећа у једро, димеризована и активирана форма STAT протеина, индукује експресију неколико стотина гена који учествују у ћелијској пролиферацији и заштити од апоптозе. Због тога је STAT молекул важан медијатор у трансформацији различитих хуманих карцинома.(50)

1.1.2.3. Wnt- β катенински пут

Поред RTK \rightarrow Sos \rightarrow Ras каскаде и Wnt- β катенински пут посредује у одговору на стимулацију екстрацелуларним митогеном. У хуманим ткивима пронађено је најмање 19 Wnt фактора. Поред преноса митогеног сигнала, овај пут омогућава ћелијама да остану у релативно недиферентованом стадијуму, што је веома важна одлика појединих типова карцинома. Wnt фактор делује преко Frizzled рецептора супримирајући активност гликоген синтаза киназе 3β (GSK- 3β). У одсуству Wnt GSK- 3β фосфорилише неколико кључних протеина, означавајући их за деструкцију. Најважнији од ових протеинских субстрата је β -катенин, нормалан цитоплазматски протеин који може бити везан за цитоплазматски домен адхезионих рецептора, посебно E-кадхерин, може бити присутан у цитосолу и може се наћи у једру. Фосфорилацијом β -катенина, GSK- 3β означава да β -катенин за убиквитилацију, процес који осигурава брзу деструкцију β -катенина, што објашњава нормално присутне ниске концентрације у цитосолу. Када се активира Wnt

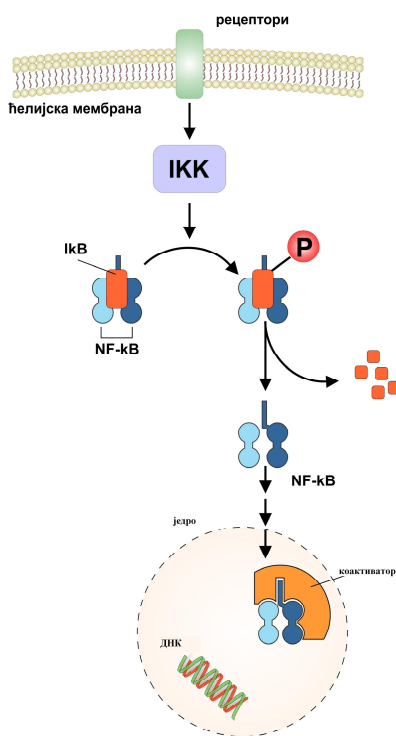
сигнализација, блокира се GSK-3 β , и β -катенин не бива уништен; његов полуживот се са мање од 20 минута повећава на 1-2 сата, и његова концентрација у ћелији се пропорционално повећава. Молекули β -катенина затим мигрирају у једро и везују Tcf/Lef протеин, што даље активира експресију многих важних гена, нарочито оних који кодирају протеине битне за раст и пролиферацију, као што су D1 и Мус. Поред β -катенина GSK-3 β може да фосфорилише и друге протеине битне за регулацију раста. Фосфорилацијом циклина D1, GSK-3 β га означава за деградацију. Wnt пут модулира експресију циклина D1 како на нивоу његове транскрипције, тако и на посттранслационом нивоу. Поред тога што учествује у морфогенези, Wnt може да делује као потентан митоген, баш као лиганди многих тирозин киназних рецептора. Висок ниво β -катенина у интестиналним матичним ћелијама осигурава да ове ћелије остану у недиферентованом стању уместо да се развијају у специјализоване ћелије цревног епитела. Овако високи нивои β -катенина битни су за развоја карцинома колона. β -катенин формира део цитоплазматског комплекса преко којег адхезиони рецептори, нарочито E-кадхерин, постају физички повезани са цитоскелетом. У епителним ћелијама, већина молекула β -катенина је повезана са цитоплазматским доменима молекула E-кадхерина плазма мембране што формира адхерентне спојеве међу ћелијама. Ћелије које изгубе E-кадхерин, ослобађају β -катенин који постаје слободан и транслоцира се у једро где делује као активатор транскрипције. (51)

У многим хуманим карциномима дојке експресија одређених Wnt молекула је већа 4 до 10 пута у поређењу са нормалним ћелијама. У скоро 20% узнатредовалих карцинома простате постоји нуклеарна транслокација β -катенина. У 5-7% карцинома простате мутација гена за β -катенин узрокује настанак протеина који GSK-3 β више не може да фосфорилише и последично се β -катенин акумулира у једру. Овакве мутације су забележене и у карциному јетре, колона, ендометријума, оваријума и у меланомима. У скоро свим карциномима колона деградација β -катенина је погрешна, због мутације у Арс протеину који олакшава његову деградацију. (52)

Описан Wnt- β -катенински пут се назива „канонски Wnt“, и разликује се од „неканонског Wnt“ сигналног пута који се активира подргрупом Wnt лиганда који су независни од функције β -катенина, и њихова улога у туморској патогенези је мала. (51,53)

1.1.2.4. Сигнални пут који активира нуклеарни фактор кВ

Важност овог пута у патогенези карцинома први пут је забележена открићем *rel* онкогена у брзо трансформишућем ћурећем ретровирусу одговорном за ретикулоендотелиозу, В-ћелијски лимфом. Истраживањем транскрипционих фактора одговорних за регулацију експресије гена за имуноглобулине, откривено је да Rel протеин припада групи транскрипционих фактора који носе назив NF-кВ. Ови протеини у цитоплазми формирају хомо- и хетеродимере. Најпознатији међу њима је NF-кВ, хетеродимер који се састоји од субјединица p65 и p60. Он је у цитоплазми подељен трећим полипептидом IкВ, који је инхибитор NF-кВ. Када је у овој форми (са IкВ), он је у стању мировања. У одговору на сигнале који могу бити различитог порекла, IкВ постаје фосфорилисан, и самим тим означен за брзу деструкцију. Резултат тога је ослобађање NF-кВ од IкВ, и његово мигрирање у једро где активира експресију групе од чак 500 гена (слика 6).

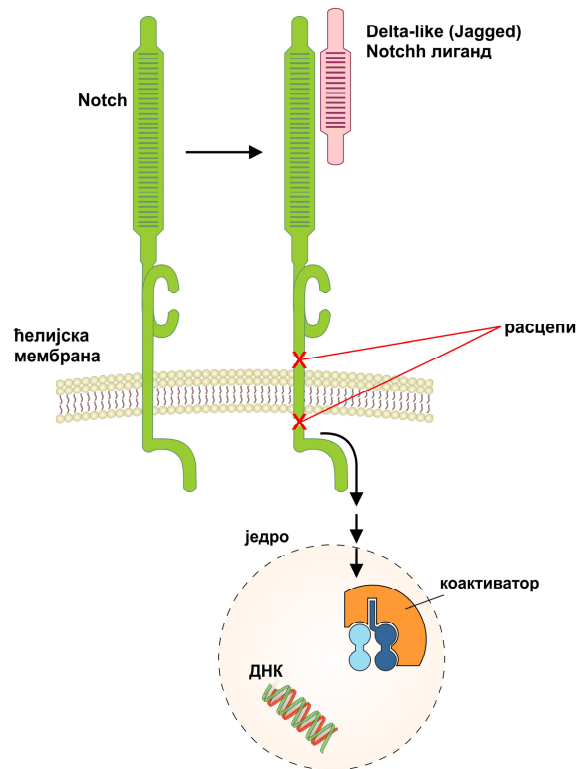


Слика 6. NF-кВ транскрипциони фактор

Киназа која фосфорилише и самим тим деструише IкВ, IкВ киназа или једноставно ИКК, истовремено активира NF-кВ сигнализацију. NF-кВ утиче на преживљавање ћелија, као и на пролиферацију. Када доспеју у једно, NF-кВs индукују експресију антиапоптоличких гена, који кодирају протеине Bcl-2 и IAP-1 и 2. Истовремено индукују експресију мус и циклин D1 гена, који кодирају важне компоненте ћелијског циклуса. На овај начин NF-кВs штите малигне ћелије од програмиране ћелијске смрти и истовремено их воде у пролиферацију.(54) Иако су компоненте NF-кВs сигналног пута ретко нађене у мутираном облику у хуманим карциномима, често је нађена конститутивна активност овог сигналног пута. У 30% карцинома дојке нађена је прекомерна експресија ИКК, што овај сигнални пут чини високо активним. Овај сигнални пут има најважнију улогу у малигномима лимфоцитне лозе. REL ген који кодира једну од субјединица NF-кВ, амплификован је у око 25% дифузних, крупноћелијских В лимфома, што узрокује повећање експресије овог генског продукта за 4-35 пута. У В и Т ћелијским лимфомима и мијеломима нађена је транслокација која захвата NF-кВ локус. Дерегулација овог сигналног пута се може видети у раној фази развоја тумора ниског степена малигнитета.(55)

1.1.2.5. Notch сигнални пут

Notch је трансмембрански протеин. У ћелијама сисара постоје 4 различита Notch протеина који су продукти различитих гена. Notch представља рецептор на површини ћелије за који се везује лиганд, Jagged или Delta-like протеин. Након везивања лиганда јавља се протеолитичко цепање рецептора на два места, једно у пределу ектодомена, а друго у трансмембранском домену. Након протеолитичког расцепа у трансмембранском домену ослобађа се цитоплазматски протеински фрагмент који је пре овог расцепа био везан за плазма мембрану. Овај фрагмент Notch протеина потом мигрира у једро где у комбинацији са другим протеинима функционише као транскрипциони фактор (слика 7).



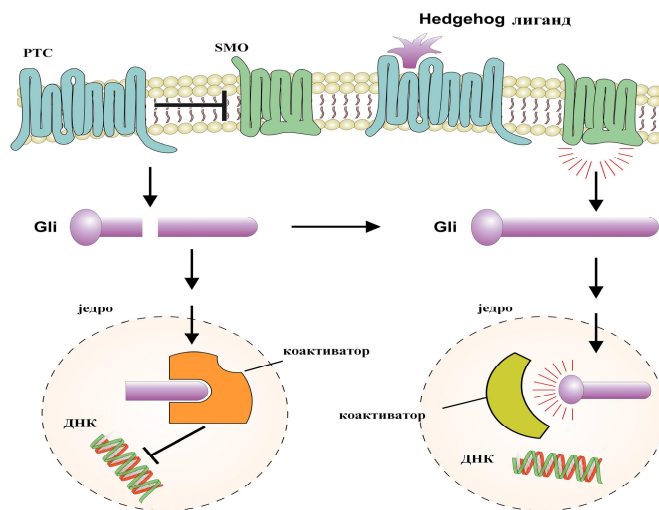
Слика 7. Notch сигнални пут

Након везивања лиганда за Notch рецептор долази до иреверзибилних промена, два протеолитичка расцепа. Активност рецептора сразмерна је броју лиганда у екстрацелуларном простору. Због поменутих иреверзибилних промена, овај рецептор након везивања лиганда може да пошаље само једном сигнал у ћелију, за разлику од тирозин киназних рецептора који након везивања лиганда могу амплификовати сигнал. Цитоплазматски домен Notch рецептора је потентан онкоген који може да трансформише ћелије *in vitro*. Измењени облици Notch рецептора учествују у патогенези хуманих карцинома. Прекомерна експресија једног од Notch протеина виђа се у сквамозелуларном карциному плућа, већини карцинома грлића материце, у неким карциномима дебелог црева и простате, као и у сквамозелуларном карциному плућа. Ову прекомерну експресију често прати и транслокација цитоплазматског домена овог рецептора у једро, што указује на активну сигнализацију овог пута у туморским ћелијама. Повећана експресија два

лиганда Notch рецептора, Jagged и Delta, такође је нађена у карциномима грлића материце и карциномима простате. У око 60% акутне лимфоцитне леукемије (Т-ћел.) нађена је конститутивно активна форма Notch рецептора која је последица делеције дела NOTCH-1 гена који кодира његов ектодомен. Notch рецептори функционишу као онкогени у малигнитетима хематопоеетског ткива, док у неким карциномима могу да функционишу као тумор супресори.(56,57)

1.1.2.6. Hedgehog сигнални пут

Везивање лиганда Hedgehog (Hh), за његов рецептор Patched (Ptc), мења интеракцију између Patched (Ptc) и Smoothened (Smo). Као последица, Smo и Gli се акумулирају у примарним цилијама, обично у самом врху. У одсуству интервенције Smo, Gli прекурсор се цепа у два фрагмента од којих један мигрира у једро где функционише као транскрипциони репресор. Након стимулације Hh, Smo и Gli интерреагују у примарном цилијуму где је Gli заштићен од фрагментирања. Тада интактан Gli мигрира у једро где делује сада као активатор транскрипције (слика 8)



Слика 8. Hedgehog сигнални пут

Gli је први пут откривен као високо експримиран протеин у глиобластомина, отуда и његов назив. У условима прекомерне експресије Gli са још неколико сродних протеина,

функционише као онкопротеин.(58) Мутација хуманог РТСН гена у герминативним ћелијама изазива Горлин синдром, наследни синдром осетљивости на канцер, који подразумева повећан ризик од мултиплих базоцелуларних карцинома коже, као и других тумора, нарочито медулобластома. Чак 50% спорадичних базоцелуларних карцинома коже, насталих услед соматске мутације, носи мутирану форму РТСН или SMO алела. Соматске мутације РТСН су нађене и у другим туморим, као што су медулобластоми и менингеоми, као и карциномима дојке и једњака. Ова мутација компромитује функцију Ptc, дозвољавајући Smo да конститутивно активира Gli транскрипциони фактор.

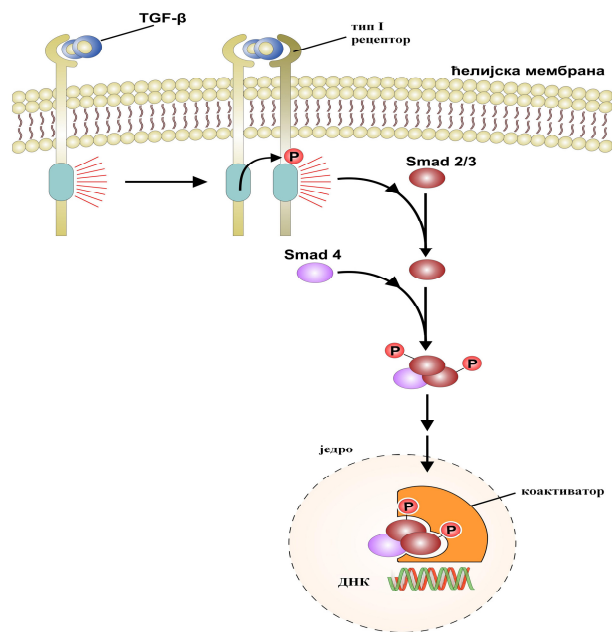
Постоје 3 Gli протеина, два стимулишу транскрипцију, док је један инхибира. Карциноми, у којима постоје мутације које погађају различите компоненте Hh-Ptc пута, представљају само мали део хуманих карцинома у којима је ова сигнална каскада хиперактивна. У неким карциномима једњака, желуца, билијарног тракта и панкреаса постоји прекомерна експресија Ptc рецептора и њихових лиганата Sonic Hh или Indian Hh. Лиганде производе епителне ћелије унутар карцинома, док су Ptc рецептори експримирани у околним стромалним ћелијама, што указује на паракрини сигнални пут. Ову чињеницу потврђују повишени нивои Gli фактора у једру стромалних ћелија.(58) Стромалне ћелије потом узвраћају митогени сигнал и сигнал за преживљавање околним ћелијама карцинома. Третман ових тумора анти-Hh антителима узрокује престанак пролиферације и смрт туморских ћелија. Сличне промене су нађене и у ситноћелијском карциному плућа.(59)

1.1.2.7. TGF- β сигнални пут

TGF- β је мултифункционални регулатор ћелијског раста и диференцијације. Јавља се у различитим изоформама TGF- β -1-5, при чему је најзаступљенија хомодимерна TGF- β -1 изоформа. У малој количини га стварају многе ћелије, као што су макрофаги, ендотелне ћелије и Т лимфоцити, док је највећа концентрација нађена у тромбоцитима и коштаном ткиву. Скоро све ћелије имају специфичан површински рецептор, бетагликан, а његов ефекат варира у зависности од типа ћелије, степена ћелијске диференцијације, присуства других фактора раста, његове концентрације у ткиву и других околности. Сматра се да је овај фактор раста стимулатор за већину ћелија мезенхималног порекла, а инхибитор за

епителне, ендотелне, хематопоетске и неуроектодермалне ћелије. TGF- β изазива фиброгенезу јер стимулише хемотаксу фибробласта, продукцију колагена и фибронектина, а истовремено инхибира деградацију колагена смањујући дејство протеаза а појачавајући дејство инхибитора протеаза. Бројне студије указују да TGF- β има и антиинфламаторно дејство.(60)

TGF- β и сигнални пут који он контролише играју главну улогу у патогенези већине или чак свих карцинома, у њиховом раном стадијуму, када спречава раст многих типова ћелија, док касније приликом прогресије карцинома доприноси њиховој инвазивности. Активација овог пута шаље Smad транскрипциони фактор у једро где се везује за специфичну тетрануклеотидну секвенцу DNA, и у сарадњи са суседним транскрипционим факторима индукује експресију многих гена, и репресију других (слика 9).



Слика 9. TGF- β сигнални пут

Smad транскрипциони фактор препознаје и везује само тетрануклеотидну секвенцу DNA, али ова веза између Smad и DNA је сувише слаба да би се одржала. Због тога се Smad

везује за DNA непосредно поред места везивања других транскрипционих фактора. Бочне везе ових протеина, Smad и других транскрипционих фактора осигуравају јаку везу са DNA. Smad може да формира овакве везе са више од 130 транскрипционих фактора.(60)

У одсуству Smad-a, епителне ћелије карцинома могу да избегну инхибицију раста коју узрокује TGF- β . Ово се често виђа у прекурсорима инвазивних хуманих карцинома панкреаса.(61)

1.1.2.8. Улога интегрина у унутарћелијској сигнализацији

У бројним истраживањима показане су промене у гликиколизацији липида и протеина на мембрани туморских ћелија. Ове структурне промене изазивају поремећаје у адхезији и међусобној комуникацији. Будући да је ћелијска адхезија неопходна за одржавање контакта међу ћелијама, губитак тих особина омогућава престанак комуникације између суседних ћелија и њихово ширење, инавазију и метастазирање. Контактна инхибиција је један од механизма којима се контролише раст ћелија, а који зависи од густине ћелија. Празан простор између нормалних ћелија попуњава се деобом, а када те ћелије дођу у контакт активира се сигнал који прекида њихову даљу деобу. За разлику од нормалних ћелија, међусобни контакт туморских ћелија не изазива престанак деобе, тако да туморске ћелије настављају да се деле и расту једне преко других формирајући више слојева. Истовремено промене на мембрани ремете промет неорганских јона, као и низа других већих молекула. Кроз мембрану туморских ћелија поремећен је транспорт великих гликопротеинских молекула као што је фибронектин (чије су вредности повећане на спољашњој површини мембране, а смањене у ћелијама). Осим тога показано је да неке туморске ћелије секретују фактор активације плазмногена који помаже разградњу екстраћелијског матрикса и инвазију тумора у околно ткиво.

Веза компоненти екстрацелуларног матрикса са интегринима шаље кроз цитоплазму сигнал за преживљавање ћелија који смањује вероватноћу уласка ћелије у апоптозу. Истовремено, активацијом интегрина сигнаlima који потичу из ћелије, промовише се мотилитет ћелије стимулацијом молекула интегрина локализованих на специфичним местима на плазма мембрани, успостављајући на тај начин нове везе са екстрацелуларним матриксом. Интегрини могу да се групишу и формирају мултипле везе

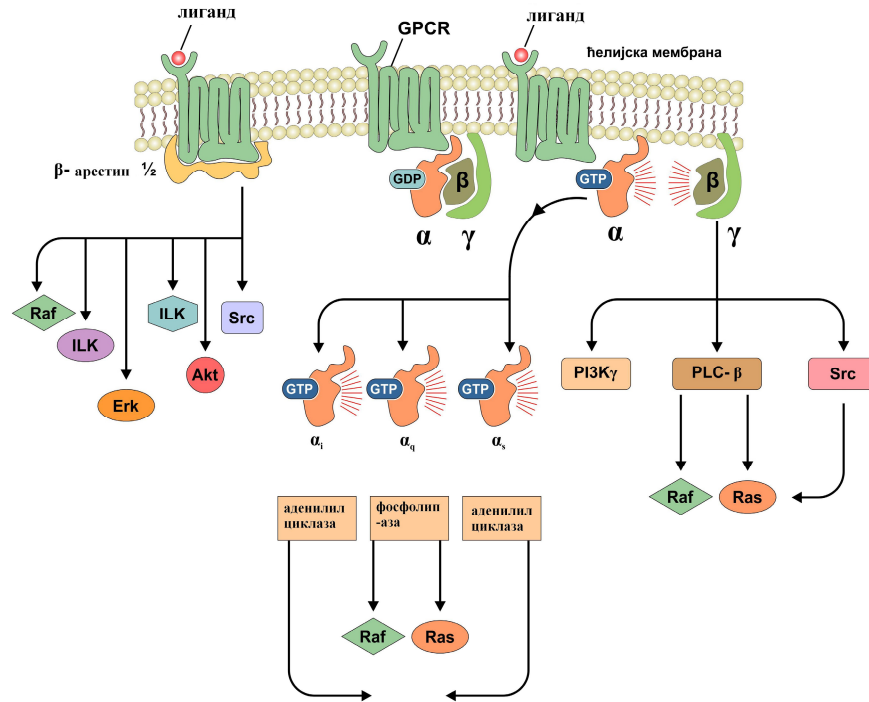
са екстрацелуларним матриksom формирајући мала поља названа фокалне адхезије. Ово груписање изазива активацију фокалних адхезионих киназа (FAK), нерецепторских тирозин киназа сличних Src. FAK је удружен са цитоплазматским доменом β субјединице одређених молекула интегринa и постаје активиран вероватно трансфосфорилацијом. Један од насталих фосфотирозинских остатака на FAK молекулу обезбеђује везивање за одговарајуће место на Src молекулу. Src потом наставља да фосфорилише остале тирозине на FAK молекулу, а настали фосфотирозини служе као везивајућа места за друге сигналне молекуле који садрже SH2 домene, као што су Grb2, Shc, PI3K, and PLC- γ . Grb2 везан за фосфотирозин FAK-a, може да привуче Sos који даље активира Ras.

Тирозин киназни рецептор везује свој лиганд, фактор раста, у екстрацелуларном простору, док компоненте екстрацелуларног матрикса служе као лиганди интегринима. Једном активирани, ове две групе сигналних путева, активирају многе од нисходних сигналних каскада. У одсуству сигнализације интегринима, ћелија не добија сигнал да је повезана са екстрацелуларним матриksom. Ово спречава ћелију да расте и да се дели или је уводи у апоптозу, облик програмиране ћелијске смрти која се активира приликом губитка ћелијског контакта са чврстом подлогом. Спречавање апоптоза представља први корак у настанку рака дојке. Ћелијски адхециони молекули емитују сигнал који се уклапа са сигнаlima који настају након стимулације рецептора фактора раста.(62,63)

1.1.2.9. Улога „G-протеин везаних рецептора“ у унутарћелијској сигнализацији

G-протеин везани рецептори су трансмембрански протеини који 7 пута пролазе кроз плазма мембрану. Након везивања екстрацелуларног лиганда, сваки од ових серпентинских рецептора активира један или више врста цитоплазматских хетеродимерних G-протеина које чине три различите субјединице G_α , G_β и G_γ . Активирано стање G_α постиже се везивањем GTP-a. Након стимулације рецептора α субјединица хетеродимерног G-протеина, раздваја се од β и γ субјединице и наставља да активира бројне различите цитоплазматске ензиме. Међу њима су аденил циклаза која конвертује АТФ у циклични АМФ (сАМФ), и фосфолипаза C- β (PLC- β) која разлаже PIP₃

на DAG и IP3. Ови продукти су снажни секундарни гласници који стимулишу пролиферацију ћелије (слика 10).



Слика 10. G-протеин везани рецептор у унутарћелијској сигнализацији

Постоје докази да Src киназа може бити активирана активираним α субјединицом G-протеина. Друге две субјединице хетеродимерног G-протеина, β и γ , стимулишу друге важне митогене сигналне протеине, као што је једна форма PI3K. Способност G-протеин везаних рецептора да активирају митогене путеве, сугерише да дерегулација рецептора и удружених G-протеина може да допринесе развој ћелијске трансформације и туморогенезе.(64)

Улога G-протеин везаних рецептора у патогенези хуманих карцинома најбоље се види на примеру ситноћелијског карцинома плућа. Ћелије овог тумора отпуштају броје различите пептидне факторе које препознају и везују G-протеински рецептори и стварају на тај начин вишеструке аутокрине сигналне путеве. Ситноћелијски карцином плућа може

истовремено да секретује: бомбестин, брадикинин, холецистокинин, гастрин, неуротензин и вазопресин. Ова аутокрини сигнали су одговорни за пролиферацију и преживљавање ћелија ситноћелијског карцинома плућа. Уколико се ћелије овог карцинома инкубирају *in vitro* у присуству антитела која везују и неутралишу секретоване аутокрине факторе раста, престаће да расту. Ово указује на то да је раст ћелија овог карцинома завистан од аутокриних фактора раста што се може применити и у терапијске сврхе. (65)

1.1.3. Регулација ћелијског циклуса

Нормална ћелија испољава високо регулисан систем пролиферације и диференцијације који одговара на стимулацију и екстра-и интрацелуларним сигнаlima.

Ћелије рака су „побегле“ овим регулаторним ограничењима кроз мутације на генима који контролишу пролиферацију ћелија, тако да су у стању да расту и размножавају се без или са мало ограничења. Уз то, ћелијски циклус туморских ћелија је дужи од ћелијског циклуса одговарајућих нормалних ћелија. Познато је да ћелијски циклус нормалних ћелија коштане сржи код човека траје од 0.7 до 1.1 дан, а код ћелија акутне мијелоидне леукемије 1.5 до 3 дана, односно хроничне мијелоидне леукемије 2.0 до 2,5 дана. Важно је време за које се удвостручи ћелијска популација, што зависи не само од ћелијског циклуса, већ и од броја ћелија које се деле. Зато је важно разумевање механизма који контролишу и регулишу ћелијски циклус. (1-6)

Ћелијски циклус (енгл. cell cycle, или cell-division cycle), представља низ догађаја који се одвијају у ћелији и воде до њене деобе и дуплирања (репликација). Док код прокариота долази до бинарне фисије (енгл. binary fission), код еукариота ћелијски циклус се може поделити на два периода: интерфазу и фазу деобе. Интерфаза је такође позната као припремна фаза и може се поделити на три фазе: G1, S и G2. Током интерфазе ћелија расте гомилајући хранљиве материје потребне за митозу и репликацију ДНК-а. Фаза деобе код еукариотских ћелија обухвата поделу једра (кариокинеза) и поделу цитоплазме и њених органа (цитокинеза).

Ћелије које су привремено или реверзибилно зауставиле деобу, улазе у стање мировања или G0 фазу где остатају дуже време или чак заувек (као што је често случај са

неуронима). Ово је уобичајено за терминално диференциране ћелије. Услед оштећења ДНК долази до ћелијског старења (енгл. Cellular senescence) и следствено уласка у G0 фазу. У супротом, деобом овакве ћелије може настати тумор.

G1 фаза је прва фаза у оквиру интерфазе, која се зове и фаза раста. Ова фаза се карактерише формирањем милиона протеина, а касније и ензима који су потребни у S фази за репликацију ДНК. Трајање G1 је врло променљиво, чак и међу различитим ћелијама исте врсте. Налази се под контролом p53 гена.(1-6)

S фаза је фаза „синтезе“, односно репликације ДНК. По завршетку свака хроматида хромосома садржи по једну ДНК.

G2 фаза траје до уласка ћелије у митозу. Током ове фазе такође долази до синтезе протеина, углавном микротубула који су неопходни у процесу митозе. Тако, инхибиција синтезе протеина током ове фазе, спречава отпочињање деобе.

Регулација ћелијског циклуса обухвата процесе кључне за опстанак ћелије, укључујући откривање и поправку генетског оштећења као и спречавање неконтролисана деобе ћелија. За одвијање ћелијског циклуса најважније су три групе протеина: циклини, Циклин-зависне киназе (енгл. cyclin-dependent kinases CDKs) и инхибитори циклин-зависних киназа (енгл. Cdk inhibitor proteins, CKIs).(1-6)

Циклини су фамилија протеина који контролишу ћелијски циклус активацијом ензима циклин зависних киназа. Постоје две групе циклина: G1/S циклини који су кључни у контроли ћелијског циклуса при преласку из G1 фазе у S фазу (Cyclin A/CDK2– активни у S фази; Cyclin D/CDK4, Cyclin D /CDK6, и Cyclin E/ CDK2 – регулишу прелаз из G1 у S фазу) и G2/M циклини који су кључни у контроли ћелијског циклуса при преласку из G2 фазе у M фазу (Cyclin B/CDK1).

Циклин зависне киназе чине фамилију протеин киназа укључених у ћелијски циклус. CDKs везујући се за циклине формирају комплекс. CDKs су серин/треонин киназе које фосфорилишу серинске тј. треонинске остатке супстрата. Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt и Paul M. Nurse су 2001. године добили Нобелову награду за откриће ових молекула. Дакле, активирани хетеродимер чини субјединица циклина која има

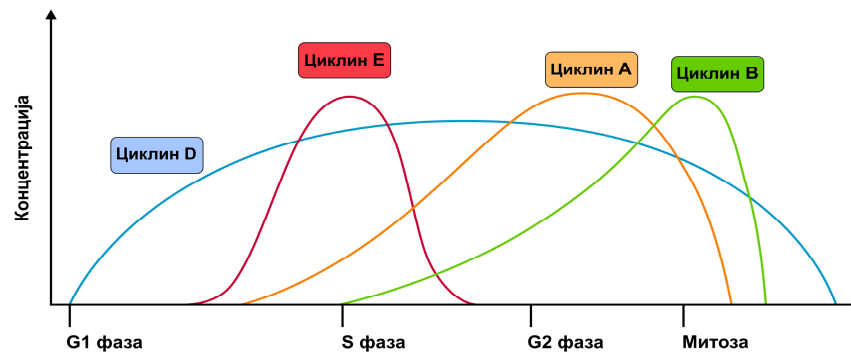
регулаторну улогу и CDKs субјединица која има каталитичку функцију. CDKs је неактиван док се не веже за циклин. По везивању долази до фосфорилације и последично активације или инактивације одређених протеина. Постоји 4 главана механизма контролисања CDKs: везивање циклина, фосфорилација САК (CDK-activating kinase), инхибиторна фосфорилација, везивање CKIs (Cdk inhibitor proteins). Све киназе имају АТП везујуће место (енгл. ATP-binding site) које се налази између мањег аминокраја и дужег карбоксилног краја. Међутим, испитивања на хуманој Cdk2 су показала да CDKs имају нешто другачије везујуће место у односу на друге киназе, јер тзв. Т петља прекрива активно место. Кључни моменат је везивање циклина који склањају Т петљу и „откривају“ везујуће место доводећи до парцијалне активације комплекса. До потпуне активације комплекса долази захваљујући САК која доводи до фосфорилације треонина на позицији 161 у близини активног места. САК (енгл. CDK-activating kinase) активира cyclin-CDK комплекс фосфорилацијом треонинских остатака на позицији 161 CDK петље. Дакле, резимирано, за активацију CDK неопходна су два корака. Прво, везивање циклина за CDK, а друго, фосфорилација формираног комплекса cyclin-Cdk од стране САК. За разлику од активирајуће фосфорилације, инхибишућа фосфорилација је такође битна за регулацију ћелијског циклуса. Различите киназе и фосфатазе регулишу ниво фосфата. Тако, једна од киназа, присутна код свих еукариота је Wee1 киназа која фосфорилацијом треонинских остатака доводи до инхибиције комплекса. У супротном смеру делује Cdc25 фосфатаза која уклањајући фосфатну групу доводи до поновне активације комплекса.

Две породице гена, cip/kip family (енгл. CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) и INK4a/ARF (енгл. Inhibitor of Kinase 4/Alternative Reading Frame) спречава прогресију ћелијског циклуса. Пошто су ови гени такође битни у превенцији тумора, познати су и као тумор супресори. INK4 протеини делују само инхибиторно и само на CDK мономере, док cip/kip протеини могу да делују и на циклине и CDK, и активацијски, и инхибиторно. У cip/kip фамилију спадају гени p21, p27 и p57. Везивањем и инактивацијом cyclin-CDK комплекса они заустављају ћелијски циклус у G1 фази. Тумор супресорни ген p53 који се активира по оштећењу ДНК (нпр. услед радијације) је одговоран за активацију p21. Са друге стране TGF β (Transforming Growth Factor β) активира p27 ген. У INK4a/ARF фамилију спада p16, p15, p18 и p19. Инхибитор p16 се

везује за CDK4 и тако зауставља ћелијски циклус у G1 фази, а p19ARF спречава деградацију p53.

За нормално одвијање ћелијског циклуса важна је интеракција циклина, циклин зависних киназа и њихових инхибитора (слика 11). Естрацелуларни сигнал (нпр. фактор раста) активира G1 циклине, најпре Cyclin D1,2,3. Cyclin D се везује за CDK4,6 формирајући комплекс cyclin D1,2,3/CDK4,6 који фосфорилише Rb (енгл. retinoblastoma protein). Хиперфосфорилисани Rb се одваја од комплекса E2F/DP1/Rb и активира се E2F. Активација E2F резултира транскрипцијом гена као што су cyclin E, cyclin A, DNA polymerase, thymidine kinase итд. Паралелно c-Myc такође доводи до транскрипције гена за cyclin E и cdc25A. Сада се Cyclin E везује за CDK2 формирајући комплекс cyclin E-CDK2 који доводи до преласка ћелије из G1 фазе у S. Cyclin B са cdc2 (односно CDK1 код сисара) формира cyclin B-cdc2 комплекс који доводи до преласка из G2 фазе у M фазу. Активацијом овог комплекса долази до поделе једарне мембране и почетка профазе, док његовом деактивацијом престаје митоза. Ретинобластома протеин превенира репликацију оштећене ДНК тако што инхибира E2F транскрипциони фактор који би иначе доводио до прогресије ћелијског циклуса, односно преласка у S фазу. Када дође време за улазак у наредну фазу и наставак циклуса, cyclin-CDK комплекс фосфорилише pRb. За иницијалну фосфорилацију је заслужан комплекс Cyclin D/CDK4/CDK6, а затим Cyclin E/CDK2. Значи, pRb остаје фосфорилисан током S, G2 и M фазе. Насупрот овоме, у хипофосфорилисаном стању, pRb делује као тумор супресорни протеин који онемогућава прогресију ћелијског циклуса. Дакле, по примању сигнала G1 cyclin-CDK комплекс се активира и отпочиње да припрема ћелију за наредну фазу. Долази до експресије транскрипционих фактора потребних за синтезу S циклина и ензима неопходних за репликацију ДНК. Односно, до убиквитације и протеозомалне деградације протеина који делују инхибиторно у S фази. Активиран S cyclin-CDK комплекс фосфорилише протеине пререпликацијског комплекса који настаје на орицинима ДНК молекула (енгл. DNA replication origins) током G1 фазе. Фосфорилација има за циљ да активира већ формиран пререпликацијски комплекс, односно да спречи формирање новог. На овај начин се осигурава да се сваки део генома репликује само једном. То је веома битно знајући да

ћерка ћелија којој недостаје део или сви кључни гени умире, а њиховом мутацијом омогућена је неконтролисана ћелијска деоба и канцерогенеза.(1-6,66)



слика 11. Циклини и циклин зависне киназе

1.1.4. Молекулска основа дисеминације тумора

Свака генетска промена „пролази” клонску селекцију. Прогресија тумора је аналогна Дарвиновој селекцији. У оквиру туморске масе доминираће клонска популација са фенотипским предностима у односу на друге клонове: аутономија раста, неосетљивост на инхибиторне сигнале, „избегавање” апоптозе и друге. Метастазирање представља последњи корак у прогресији тумора. Као и код туморгенезе, туморске ћелије са метастатским капацитетом настају процесом аналогним Дарвиновој природној селекцији, коју омогућавају генетске промене. Доминантан клон туморских ћелија у примарном тумору кроз серију генетских промена стиче „еволутивну предност” тј. способност метастазирања.

Друга теорија сматра да метастазе настају од малобројних „метастатских форми” у примарним туморима. По овој теорији немају све ћелије примарног тумора исти

метастатски капацитет. Способност метастазирања не даје овим ћелијама предност у расту те оне чине малу популацију унутар примарног тумора.

Транскриптом представља профил активних гена у једној ћелији. Упоредном анализом транскриптома неметастатских и метастатских ћелија примарног тумора идентификовано је 15 до 70 гена (број гена варира од врсте тумора) који дефинишу разлику у способности метастазирања. Стога, стицање метастатског капацитета подразумева серију генетских промена.(67)

За стицање метастатске способности потребна је активација додатних „метастатских ефекторских гена“ или инактивација „метастатских супресорских гена“. Ове промене се дешавају на темељу генетски измењене ћелије, која је у процесу туморгенезе. Неколико „метастатских супресорских гена“ идентификовано је због смањења експресије у ћелијама са метастатским капацитетом, у поређењу са туморским ћелијама без способности метастазирања. Реекспресија „метастатских супресорских гена“ у туморским ћелијским линијама смањује метастатски капацитет ових ћелија, *in vivo*, без утицаја на остале особине туморске ћелије.

Процес формирања метастазе, данас се уобичајено зове метастатска каскада. Ову каскаду сачињава серија међусобно зависних догађаја:

1. одвајање ћелије од примарне туморске масе
2. пробијање базалне мембране и долазак у циркулацију
3. преживљавање у циркулацији
4. екстравазација у паренхиме органа
5. осетљивост на паракрине факторе раста, пролиферација и ангиогенеза

Експериментално је показано да након интравенске апликације врло метастатских туморских ћелија, само 0,01% формира метастатске колоније. Број циркулишућих туморских ћелија корелира са величином примарног тумора, из већег тумора одваја се више туморских ћелија. Међутим, број циркулишућих туморских ћелија не корелира са клиничким исходом метастаза. Немогућност туморских ћелија да комплетирају метастатску каскаду делом је због чињенице да је за успешно формирање метастатске колоније потребно неколико веома комплексних и међусобно повезаних догађаја. Према

томе, догађаји укључени у метастатску каскаду такође представљају процес селекције, као код Дарвинове теорије еволуције. Само оне туморске ћелије које стекну потребне генетске промене могу успешно да формирају метастатска жаришта.

Други разлог немогућности туморских ћелија да комплетирају метастатску каскаду јесте да већина туморских ћелија које доспеју у циркулацију јесу у процесу умирања. Туморске ћелије у циркулацији карактерише двоструко већа спонтана апоптоза у одноду на исте у примарном тумору. Нису све циркулишуће туморске ћелије метастатски компетентне, способне да колонизују удаљене органе.

Током 1889. *Stephen Paget* је поставио „семе и земљиште (енгл. *seed and soil*)“ теорију метастазирања. *Paget* је приметио да неки тумори дају метастазе у специфичним органима и да место метастазирања није случајност. Сматрао је да на метастазирање утиче микросредина циљног органа. Ову теорију је оспорио *James Ewing*, који је сматрао да на локализацију метастаза утичу анатомски положај примарног тумора и циркулација. Ове две теорије не искључују једна другу у потпуности и новија истраживања подупиру обе теорије. Наиме, дренирање портне циркулације кроз јетру чини овај орган примарним местом метастазирања узнапредовалих колоректалних карцинома. Али, такође је потврђено да микросредина јетре утиче на раст метастатских туморских ћелија преко још увек неистражених механизма.

Покретљивост туморских ћелија је веома важна компонента инвазивног фенотипа. Примарни патохистолошки догађај у прогресији тумора је пробијање епителне базалне мембране и доспевање туморских ћелија у стромалну средину. За разлику од бенигних, малигне туморе карактерише губитак базалне мембране око инвазивног туморског ткива. Када се једном интегритет базалне мембране наруши, немогуће је одредити број или локализацију туморских ћелија које су се одвојиле од примарног тумора. Иницијални догађај у покретљивости ћелија јесу промене у ћелијској адхезивности: међућелијске везе и интеракције ћелија са екстрацелуларним матриксом (ЕСМ). Туморске ћелије смањују број и интензитет ћелијских и матриксних веза у циљу одвајања од примарне туморске масе. Међутим, у каснијим фазама метастатске каскаде, туморске ћелије појачавају адхезивне интеракције са суседним ћелијама и ЕСМ. Протеолитичко ремоделирање ЕСМ сматра се важним кораком у метастатској каскади. Туморске ћелије морају да се крећу

кроз везивно ткиво: базалну мембрану и међућелијски матрикс да би стигли до циркулације. Иако су многе протеазе укључене у овај процес, највећи значај се придаје металопротеиназама- MMP. MMP и њихови специфични инхибитори, ткивни инхибитори меалопротеиназа играју значајну улогу у физиолошком ремоделирању ECM. До данас је описано 26 MMP и 4 ткивна инхибитора код људи и животиња.

Раст и прогресија тумора зависе од успостављања адекватне снабдевености крвљу. Потребан је настанак нових крвних судова да би се испратиле потребе растућег туморског ткива. Ангиогенеза је последица дисбаланса про- и анти-ангиогенетских молекула у ткивној микросредини. Током 1971. Folkman поставља темеље значаја ангиогенезе за прогресију тумора. Закључује да солидни тумори неће расти преко величине од 1-2 см без додатне снабдевености крвљу- крвним судовима. Давање анти ангиогенетских агенаса супримира даљу неоваскуларизацију тумора и раст туморске масе, што непосредно потврђује теорију. Ангиогенезу чини серија догађаја која води до повећања снабдевености крвљу у туморском ткиву. Туморске ћелије као и тумор инфилтришуће ћелије имунског система домаћина секретују ангиогенетске факторе раста, који се затим везују за специфичне рецепторе на ендотелним ћелијама. Ова лиганд - рецептор интеракција доводи до пролиферације ендотела, миграције, инвазивности и, на крају, до формирања капиларних судова. Про-ангиогенетска активност је у балансу са активношћу анти-ангиогенетских молекула. Када се баланс помери у корист про-ангиогенетских фактора, настају нови крвни судови. Активност про-ангиогенетских фактора могу да повећају хипоксија, низак рН, цитокини, фактори раста, величина тумора, онкогени или губитак функције тумор супресор гена.

Virchow је први открио леукоците у и на граници туморског ткива 1863. Данас се зна да тумор- асоцирани макрофаги (TAMs) чине већи део леукоцитног инфилтрата око многих тумора (и примарних и метастаза). TAMs имају бројне функције, утичу на раст тумора двојачко: прогресивно и регресивно. Макрофаги имају важну улогу у ангиогенези тумора. Они могу да индукују раст и развој крвних судова на више начина. Макрофаги директно секретују про-ангиогенетске факторе. Данас је познато преко 20 молекула које секретују макрофаги а утичу на пролиферацију, миграцију и диференцијацију ендотелних ћелија: *Transforming growth factor- α and - β , insulin-like growth factor-1*, PDGF и VEGF. Макрофаги,

такође, модификују ЕСМ. Грађа ЕСМ утиче на раст нових крвних судова. Макрофаги ремоделирају ЕСМ продукцијом неких компоненти истог или секрецијом протеаза. Они активно синтетишу металопроотеиназе MMP-2 и MMP-9, које су веома активне у неоваскуларизацији многих тумора.(68,69)

1.1.5. Матичне ћелије тумора

Познато је да конвенционалана хемотерапија делује на диференциране ћелије и ћелије у процесу диференцијације, али не и на матичне ћелије тумора (енгл. *Cancer stem cells*, CSCs) које смо, њихов настанак и значај у канцерогенези, детаљније описали у овом поглављу.

Матичне ћелије тумора се називају *туморским* јер се изолују из тумора, а *матичним* јер, као и нормалне матичне ћелије, имају способност самообнављања и диференцијације у различите типове ћелија. Односно, чине субпопулацију туморских ћелија које су одговорне за настанак рецидива и метастаза тумора. Предмет бројних медицинских истраживања је утврђивање сличности и разлика између туморских и нормалних орган специфичних матичних ћелија. Такође, поставља се питање да ли ове ћелије потичу од матичних ћелија које су изгубиле могућност регулације пролиферација, или од прогениторских ћелија које су стекле способност самообнављања.

Bonnet и Dick су први, 1997. године у *Nature Medicine*, објавили рад о матичним ћелијама тумора. Они су изоловали леукемијске ћелије које експримирају површински маркер CD34, а недостаје им CD38. Дакле, аутори су потврдили да ова субпопулација CD34+/CD38- ћелија може иницирати настанак тумора код NOD/SCID мишева. Сматра се да CSCs које имају способност формирања тумора, чине само један мали део од укупног броја туморских ћелија. Тако нпр. у акутној мијелоидној леукемији код човека чине мање од 1 на 10.000 ћелија. Хистолошки, многи тумори су хетерогени садрже више различитих типова ћелија. Како се ова хетерогеност задржава и у удаљеним метастазама, може се закључити да више типова ћелија настаје од изворне туморске матичне ћелије. Дакле, као и нормалне (нетуморске) матичне ћелије, и CSCs су потентне и могу дати више различитих типова ћелија.(70)

Постоји више теорија о пореклу туморских матичних ћелија: постоји могућност да настају мутацијом матичних ћелија, прогениторских ћелија и терминално диференцираних ћелија. Постоје две теорије које описују могући настанак CSCs: теорија туморских матичних ћелија и стохистичка теорија.

Према првој теорији туморско ткиво расте као и друга нормална ткива организма. Односно, од матичне ћелије (која је хијерархијски највиша) настају прогениторске ћелије, а од њих диференциране или специјализоване ћелије. При томе, матичне ћелије имају способност самообнављања. Односно деобама повећава се број и матичних ћелија и ТА (транзитних појачавајућих ћелија). ТА се деле неколико пута, а затим дају диференцирану ћелију која више нема могућност дељења. Значи, према овој теорији формирање тумора је организова процес где од туморске матичне ћелије настају све ћелије тумора.

Према овој теорији, канцерске матичне ћелије настају само конверзијом из нормалних матичних ћелија због насталих бројних мутација. Дакле, према овој теорији туморогенза почиње нагомилавањем мутација у једној врсти матичних ћелија из којих настају туморске матичне ћелије, односно касније цео тумор.

За разлику од претходне теорије, према стохистичкој- свака ћелија тумора има могућност и деобе и самообнављања. Дакле, формирање тумора није организован и уређен процес и по принципу случајности (стохистички) долази или до диференцијације или самообнављања ћелија тумора. Тачније, најважнији разлог је највероватније мутација и поремећена функција p53 гена, у било којој ћелији организма (а не само у матичним ћелијама) што резултира настанком туморске матичне ћелије, па и целог тумора.

Дакле, резимирано, према првој теорији туморске матичне ћелије и тумор могу настати само мутацијама у матичним ћелијама, а према другој – све ћелије организма имају потенцијал за канцерогенезу. Вероватно да су и једна и друга теорија тачне, у зависности од врсте тумора. Односно, настанак неких тумора се вероватно боље објашњава теоријом туморских матичних ћелија док се развој других тумора боље објашњава стохистичком теоријом.(66-70)

1.1.6. Апоптоза

Апоптоза, или програмирана ћелијска смрт, је генетски регулисан облик ћелијске смрти који је, у нормалним околностима, укључен у органогенезу, ткивну хомеостазу и у процес сазревања лимфоцита у централним лимфним органима, односно важан је за елиминацију аутореактивних клонова. Апоптоза такође служи и као заштитни механизам, спречава развој тумора. Апоптоза се може активирати као одговор на спољне наддражаје, укључујући и различите факторе раста, или као одговор на дејство неколико токсичних агенаса, укључујући и хемиотерапеутике и јонизујуће зрачење. (71,72)

У апоптози, за разлику од ћелијске некрозе, ћелија се смањује и кондензује, а карактерише је фрагментација једарне ДНК. Постоје припремљена и неприпремљена апоптоза. Припремљена апоптоза је пронађена у већини ћелија хематопоезне лозе, где су сви ефекторни молекули јасно изражени унутар ћелије током њеног циклуса. У овим ћелијама процес апоптозе се покреће без приступања транскрипцији гена за апоптозу. У неприпремљеној апоптози, транскрипција гена је потребна, а процес се одвија спорије него у припремљеној апоптози. У овом случају ћелије успешно прођу кроз једну фазу ћелијског циклуса, док у наредној фази улазе у процес апоптозе.(73,74)

Индукција апоптозе обухвата активацију цитосолних ензима званих каспазе. Каспазе су цитоплазматске цистеинил- аспартатно специфичне ендопроотеазе које уништавају есенцијалне структурне компоненте укључујући генетски материјал ћелије. Тако су назване зато што цепају субстрате са аспартатским киселинским остацима. Каспазе су присутне у цитоплазми већине ћелија у инактивној форми, као проензими. Активирају се каскадно протеолитичким цепањем, а редослед њихове активације зависи од начина покретања апоптозе. Ова протеолитичка каскада, у којој једна каспаза активира следећу, појачава апоптотски сигнал и следствено води ка брзој ћелијској смрти. Данас је познато 14 каспаза које се означавају редним бројевима 1- 14. Неке каспазе функционишу као иницијаторске, започињу процес апоптозе (2-, 8-, 9- и 10-), неке функционишу као ефекторне или извршиоци, цепајући многе субстрате (3-, 6- и 7-), а неке као запаљенске каспазе (75-77).

Постоје два главна пута индуковања апоптозе: унутрашњи пут (тзв. митохондријални пут) и спољашњи пут (преко тзв. рецептора смрти). Међутим, данас се такође зна да су два поменута пута међусобно повезана и да молекули ангажовани у једном могу да покрену и други сигнални пут.(78)

За покретање унутрашњег пута апоптозе важна је промена интегритета мембране митохондрија. Оштећења ДНК покрећу апоптозу саме ћелије. Овакав учинак има: грешка у репликацији, дејство јонизујућег зрачења, хемиотерапеутици, лекови попут аналога нуклеозида и бројни ДНК- реактивни токсини. Реактивни кисеонични радикали који настају као продукти аеробног метаболизма могу активирати апоптозу делујући на промену пермеабилности мембране митохондрија. Сви наведени стимулуси узрокују промену интегритета унутрашње митохондријалне мембране, што резултује отварањем „пора митохондријалног транспорта“ (енгл. Mitochondrial permeability transition MPT pore), губитком трансмембранског потенцијала и ослобађањем про-апоптотичних протеина у цитосол. Након ослобађања у цитоплазму, цитохром С формира комплекс са ензимом названим апоптоза активирајући фактор-1 (Apaf-1). Комплекс активира каспазу-9, те заједно са њом гради апоптозом који активира каспазу 3, ефекторни протеин који изазива деградацију ћелије: сече актинске нити цитоскелета, ћелија се одваја, бубри, избочује се плазма мембрана- одвајају се мехурићи (blebs), апоптотска телашца.(75-79)

Контролу и регулацију апоптозе митохондријалним путем спроводе молекули чланови Bcl-2 фамилије протеина. Ови протеини контролишу пермеабилност митохондријалне мембране. Могу бити про-апоптотични и анти-апоптотични. До данас, идентификовано је 25 гена у Bcl-2 фамилији. Неки од анти-апоптотичних молекула су: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, а неки од про-апоптотичних су Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik и Bkl. Про-апоптотични протеини везују се за спољашњу мембрану митохондрија, мењајући јој интегритет. Резултат је увећање пропустљивости митохондријалне мембране улазак јона Ca²⁺ и ослобађање неколико протеина из митохондрија, укључујући цитохром С. Спољашњи пут апоптозе покреће се везивањем сигналних молекула за трансмембранске рецепторе. Најбоље описани рецептори (рецептори смрти) припадају фамилији фактора некрозе тумора (TNF) у који се убрајају рецептор за TNF, Fas, CD40. То су хомотримерни

молекули чији су екстрацелуларни делови богати цистеином, а цитоплазматски делови садрже око 80 аминокиселина и представљају тзв. домене смрти. Они играју важну улогу преношењу сигнала смрти са ћелијске мембране на интрацелуларни сигнални систем. Од познатијих лиганда и одговарајућих рецептора смрти издвајају се FasL/ FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L/DR3 (78-80).

Серија догађаја током индукције апоптозе може се објаснити FasL/ FasR интеракцијом. Везивање лиганда смрти (нпр. FasL) за рецептор смрти (Fas) групише рецептор-рецепторске тримеризације. Тримеризација иде преко адапторних протеина FADD (Fas-Associated- Death- Domain- Protein). Затим FADD везује инактивну форму каспазе-8 и активира је. Активна каспаза-8 затим активира каспазу 3, ефекторни протеин који изазива деградацију ћелије. Апоптотски пут преко TNF лиганда и рецептора сличан је описаном.

Оштећење митохондрија у FasL/ FasR сигналном путу посредована је активацијом про-апоптотичног Bid протеина каспазом 8 што је добар пример укрштања спољашњег и унутрашњег пута апоптозе.(79,80)

1.2. Клинички аспект карцинома плућа

1.2.1 Епидемиолошки подаци и етиопатогенеза карцинома плућа

Већ неколико деценија, карцином плућа најчешћи је узрок оболевања и умирања од малигнух тумора широм света. Код мушкараца широм света и даље је најчешћи карцином, а код жена четврти најчешћи малигни тумор и други најчешћи узрок смрти од малигнитета. Малигни тумори плућа и бронхија водећа су малигна локализација и у оболевању (21,3%) и у умирању (31,3%) међу мушкарцима. После карцинома дојке, колоне и ректума, карцином плућа је трећи (8,1%) по учесталости узрок оболевања и после рака дојке, други (12,1%) узрок умирања међу женама са дијагнозом малигне болести. (81)

Пушење дувана главни је један од главних фактора ризика за настанак рака плућа. Пушачи имају 20 пута већу вероватноћу да оболе од рака плућа у односу на непушаче. Пушење је одговорно за настанак рака плућа код приближно 90% мушкараца и 80% жена. Верује се да међу половима постоје разлике у осетљивости на канцерогене ефекте дуванског дима. (82)

Радон се сматра другим најважнијим узроком рака плућа. Процењено је да је радон одговоран за 2–9% појава рака плућа у земљама Европе. Канцерогени учинак радона мултиплицира се код пушача. Неколико индустријских карциногена, као што су арсен, полициклични угљоводоници, азотни оксиди, азбест, хербициди, инсектициди и други повећавају ризик за настанак рака плућа. (83)

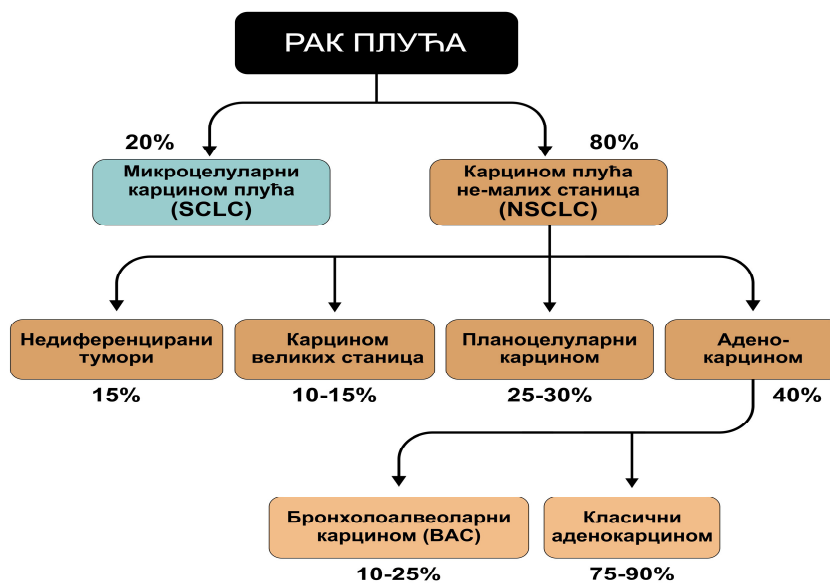
Позитивна породична анамнеза рака плућа у првом степену сродства два пута повећава ризик за појаву овог малигнома. Мета-анализе указале су на осетљивост локуса мапираног на региону 25 хромозома 6к23, као и инактивацију могућег тумор супресора гена р34 на хромозому 6q25 за настанак породичног рака плућа. Горе наведени гени који мапирају протеине одговорне за ћелијски циклус и апоптозу су такође значајни за генетску предиспозицију настанка карцинома плућа. (84,85)

Радиотерапија и друге врсте зрачења грудног коша повећавају ризик појаве рака плућа. Обољења изазвана ХИВ-ом, системски лупус ерутхематосус, Клинефелтеров синдром и друга повећавају ризик за настанак рака плућа. (86,87)

У нормалним плућима, активност матичних ћелија, према Отоу и Рајту, (88) укључује три врсте ћелија : (а) базалне ћелије бронхија и трахеје , (б) Клара ћелије у бронхиолама и (ц) тип II пнеумоците у алвеолама. Током туморске патогенезе, улога једне или више ових ћелија остаје недовољно позната. Тренутно, постоје две главне хипотезе о патогенези рака плућа. Прва је да од плурипотентне матичне ћелије могу настати тумори различите фенотипске диференцијације. Друга хипотеза заступа становиште да из различитих ћелија настају тумори различите фенотипске диференцијације. Универзално прихватање једне од ове две хипотезе још увек не постоји. (89) Неки аутори су показали да ћелија базалоидног карцинома плућа могу имати морфолошке и ултраструктурне карактеристике тотипотентних базалних ћелија у плућима, што има даје могућност да током деобе дају

истовремено више праваца диференцијације (ка сквамозним ћелијама, жлезданим ћелијама па чак и неуроендокриним ћелијама) што може да објасни хетерогеност у међу ћелијама карцинома плућа једне индивидуе. (90) Изнер и сарадници су приказали појаву локуса NSCLC у туморима који ласификовани као ситноћелијски карциноми плућа, као и обратно. (91,92) Други аутори су показали да је само 34 % од испитиваних тумора хомогено за један тип ћелија рака , а да 45 % тумора садржи две или више линија ћелија. (93) Шта тачно утиче на различиту фенотипску диференцијацију ћелија тумора томом карциногенезе, за сада остаје непознато. Нека истраживања су показала да малигна трансформација ћелија под различитим стимулусима резултира различитим фенотипима малигнућ ћелија, у зависности од врсте мутација стечене у кључним генима који контролишу ћелијски циклус пролиферације и диференцијације и апоптозу. (94)

Угрубо, карциноми плућа се деле на не-ситно-ћелијске карциноми плућа (eng. non-small cell lung cancer, NSCLC) и ситно-ћелијске карциноми плућа (eng. small cell lung cancer, SCLC).



1.2.2.1. Не-ситно-ћелијски карциноми плућа(non-small cell lung cancer, NSCLC)

1.2.2.1.1. Паноцелуларни карцином плућа

Паноцелуларни карцином чини око 30% свих карцинома плућа.(95) Две трећине сквамозних карцинома представљају централно постављене туморе плућа, док је само једна трећина истих периферна. (96,97) Већина кавернозних малигних лезија су последица паноцелуларног карцинома, док практично сви случајеви показују интраваскуларно ширење карциномских ћелија. (98) Такође, карактеришу их и интерћелијски мостови, формације „ракових перли“, а појединачни кератиноцити се крећу ка сквамозној диференцијацији. У добро диферентованих тумора, су ове особине очигледне, међутим, у слабо диферентованих тумора, њих је тешко наћи.(99) За сквамозелуларни карциноми се често сматра да настају са прогресијом метаплазије сквамозних или хиперплазије базалних ћелија од атипиче, преко дисплазије, карцинома *in situ*, до микроинвазивног карцинома. (100) Међутим, такође је могуће да се паноцелуларни карцином развије де пово на нормалној бронхијалној мукози.(101). Сквамозелуларни карцином настаје најчешће у сегментним бронхијама, док ангажовање лобарних бронхија и главних бронхија настаје растом и ширењем *per continuitatem*.(101) Хистолошки подтипови сквамозелуларног карцинома укључују папиларни карцином, *clear cell* карцином, ситноћелијски сквамозни карцином и базалоидну варијанту паноцелуларног карцинома плућа. (102,103)

1.2.2.1.2. Аденокарцином плућа

Аденокарциноми чине нешто више од 30% свих карцинома плућа. (104) Према извештају СЗО из 1999. године, аденокарциноми могу бити подељени у пет главних подтипова: ацинусни (жлездано формирање), папиларни, бронхиолоалвеоларни, чврсти са формирањем слузнице и мешовити аденокарциноми.(104) Поред тога, више варијанти аденокарцинома укључују добро диферентоване феталне аденокарциноме, (105) муцинозне ("колоидне") аденокарциноме, (106) муцинозне цистаденокарциноме, (107,108)

карциноме ћелија „печатног прстена“, (109), бронхиоалевеоларне аденокарциноме (муцинозни и немучинозни тип) и clear cell аденокарциноме.(110) Већина аденокарцинома су хистолошки хетерогени, састављени од два или више хистолошким подтипова, дакле, већина аденокарцинома спадају у мешовити подтип. Аденокарциноме формирају ацинусне (жлездане) или папиларне структуре.

1.2.2.1.3. Крупно-ћелијски карцином плућа

Крупно-ћелијски карцином плућа се састоји од великих ћелија без цитоплазматске диференцијације, и чине око 15% свих карцинома плућа. Са обманијим испитивањима која укључују различите дијагностичке и лабораторијске процедуре, ови карциноми се могу поделити на слабо диференциран аденокарцином или, ређе, карцином сквамозних ћелија. Крупно-ћелијски карциноми показују понекад неуроендокрини фенотип, сличан хистопатолошком и имунохистохемијском налазу код карциноида, међутим када се уз овакав хистопатолошки налаз нађе некроза туморских ћелија и висок степен митозе, ови карциноми су повезани са лошом прогнозом. Овај подтип крупноћелијског карцином плућа се назива *крупно-ћелијски карцином плућа са неуроендокрином морфологијом*. (111,112)

1.2.2.2. Ситно-ћелијски карцином плућа (small cell lung cancer, SCLC)

Ситно-ћелијски карцином плућа чини 20% свих карцинома плућа. (113) Око две трећине SCLC се презентују у виду перихиларне масе. SCLC се обично налази перибронхијално са инфилтрацијом бронхијалне субмукозе и перибронхијалног ткива. Бронхијална опструкција се најчешће дешава због екстралуминалне компресије, док је интралуминална опструкција као последица раста туморске масе ретка појава.(114) Екстензивне метастазе у лимфним жлездама су уобичајене. Тумор је бело-драп боје, мекан, трошан, и често показује велика поља некрозе. У до 5% случајева, SCLC се визуелним дијагностичким процедурама представља као лезија типа „периферног новчића“. (115, 116)

Мање од 10% од ситно-ћелијских карцинома плућа показују мешавину са другом компонентом хистолошког типа не-ситно-ћелијских карцинома плућа. Комбинација SCLC и крупно-ћелијског карцинома налази у око 4% до 6% случајева. (115, 116.) Око 1% до 3% СЦЛЦ може се комбиновати са аденокарциномом и планоцелуларним карциномом. (115-119) Мешавине SCLC се такође може јавити код карцинома вретенастих ћелија, (120) гигантоцелуларним карциномом, (121) и карциносаркомом. (122). Остаје да се докаже да ли су ти пацијенти имају значајне разлике у клиничким карактеристикама, прогнози и одговору на терапију. Неки докази указују на пораст меијане преживљавања код пацијената који су подвргнути одговарајућем хируршком захвату. (119).

1.2.2.3. ТНМ класификација тумора плућа

Тумор (Т) (примарни), (лимфни) нодус (Н), (удаљена) метастаза (М) (ТНМ) систем је у употреби од 1953. године (123). У области стажирања карцинома плућа, почев од 1973. године (124), стажирање је било базирано на базама података хируршких серија, све до пете ревизије, учињене 1997.године (125). У исто време је настала потреба за интернационалним приступом у базирању података. Више од једне декаде трајао је координисани напор у идентификацији институција и појединаца који би допринели остваривању заједничке интернационалне базе података пацијената, која је на крају обухватила 100. 869 случајева, од којих је 81. 495 случајева било са адекватним временским праћењем, од којих је 68.463 случаја било у групи не-ситно-ћелијских карцинома плућа (NSCLC) а 13. 032 случајева у групи ситно-ћелијских карцинома плућа (SCLC). Од овог броја, 41% је био подвргнут само хируршком ресекционом тертману, у 11% случајева је у лечењу коришћена само радиотерапија, а у 23% случајева само хемиотерапија, док је преостали проценат третиран комбинованим терапијским приступом.

На основу података 18. 198 случајева који су се квалификовали за одређивање утицаја Т стадијума дошло је до следећих промена у односу на класификацију из 1997. године (125):

T1 тумори су подкласификовани у T1a и T1b, T2 тумори у T2a и T2b, T2c тумори и додатни нодус (i) у истом режњу су класификовани као T3, док су нодус (i) у ипсилатералном режњу који не садржи примарни тумор сада класификовани као T4, а случајеви са малигном плеуралном или перикардијалном ефузијом су сада класификовани као M1. Такође, тумори > 7 cm у свом највећем дијаметру су померени из T2 у T3 категорију.

На основу података 38. 265 случајева без клиничког доказа о постојању удаљених метастаза (cM0), који су имали информације о клиничком статусу лимфних нодуса (cN) и 28. 371 хируршки третираних случајева који су имали информације о патолошком N стадијуму (pN), дошло се до закључка да постојећа класификација N стадијума (N0 - N3) не би требало да буде мењана.

У погледу метастатских лезија (M+), оне су сада подељене у M1a и M1b, од којих су прве заправо дефинисане као одвојени туморски нодул (i) у контралатералном режњу, или као тумор са плеуралним нодулима, или као малигна плеурална или перикардијална ефузија. Када је груписање дескриптора T, N и M узето као груписање стадијума, случајеви T2bN0M0 су померени из стадијума IB у стадијум IIIA, случајеви T2aN1M0 из стадијума IB у стадијум IIA, док су случајеви T4N0 - 1M0 померени из стадијума IIB у стадијум IIIA (Табела 1). Овакав приступ тумачењу унапредовалости малигне болести помаже да се уз примену добре клиничке праксе, осмисли најбољи третман за појединачног пацијента.

Окултни карцином	Tx	N0	M0
Стадијум 0	Tis	N0	M0
Стадијум IA	T1a,b	N0	M0
Стадијум IB	T2a	N0	M0
Стадијум IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Стадијум IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Стадијум IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Стадијум IIIB	T4	N2	M0
	Било који T	N3	M0
Стадијум IV	Било који T	Било који N	M1a,b

Табела 1

1.2.3. Комплекси платине и злата као потенцијално нови терапеутици за лечење карцинома плућа

Лекар који лечи болесника оболелог од малигнитета плућа цитотоксичним хемотерапијом, мора бити сигуран у дијагнозу (дефинитивни патохистолошки налаз је обавезан). Лекар и пацијент заједно морају разумети циљеве лечења тј. да ли је циљ палијација или излечење. Оптимална терапија захтева познавање природе болести, познавање самог пацијента и његовог психофизичког стања, познавање лекова који се користе, као и доступност одговарајуће лабораторијске и болничке услуге подршке. Ово нам говори да читавом третману треба приступити мултидисциплинарно. (126)

У лечењу малигних болести плућа се обично користи комбинована хемиотерапија, примена више различитих лекова која за циљ има да се избегне резистенција тумора на лек и да се умањи општа цитотоксичност. У оваковом приступу лечењу, “фактор пацијент” је веома битна ставка, због фактора као што су животна доб, стање кардиоваскуларног система, функција бубрега, очуваност функције коштане сржи и др. (127, 128). Испитивање стања ових органа и органског система у целини је од великог значаја за успех терапије. Нутритивне стање пацијента је такође важно. Неухрањени пацијенти са хипоалбуминемијом теже подносе општу цитотоксичност хемиотерапеутика (129). Одговарајуће дозне смернице за гојазне пацијенте нису доступне. (130) Измењена функција органа може елиминисати могућност да користе неки лекови (на пример, Докорубицин код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом или Блеомицин код пацијената са тешком плућном инсуфицијенцијом).

Антинеопластични лекови имају различите почетне циљеве. Међутим, сви лекови функционишу тако да изазивају поремећај унутар ћелијског циклуса који након тога покреће већ описане механизме и уводи ћелије у апоптозу. Као што је више пута напоменуто, апоптоза је нормални физиолошки процес ћелијског самоубиства, или лепше речено, жртвованја који се јавља у свим живим организмима да елиминише нежељене, функционално ненормалне и/или штетне ћелије.

Данашње лечење хемиотерапеутицима укључује велики број различитих лекова који имају различите механизме дејства. (алкилирајући агенси, комплекси платине, микротубуларни инхибитори, антимаболити и др.) Обзиром да су наши експериментни везани за комплексе платине, овде ћемо опширније говорити о историјату њихове употребе и механизмима дејства.

Употреба једињења платине лечењу рака је интензивно проучавана након открића терапеутских својстава цис-диаминодихлорплатина (II) ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, цисплатина). (131,132). Цисплатина је један од најчешће коришћених антитуморских лекова, која показује високу ефикасност против солидних тумора, посебно рака јажника и тестиса (133-135). Антиканцерогена активност цисплатине се базира на основу њене способности да формира crosslink ковалентним адуктом са ДНК везивањем Pt на N7 атома два суседна гуанин базе (132). Међутим, клиничка ефикасност цисплатине, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, ограничена је токсичним нежељеним ефекатима, посебно нефротоксичношћу, по резистенцији туморских ћелија и по уском опсегу активности (132, 136).

Платина (IV) комплекси имају већу инертност него одговарајући Pt (II) комплекси. Стога, ови комплекси имају неке предности, као што су: орална примена, смањена токсичност, као и смањење количине комплекса која је изгубљена или деактивирана на путу ка циљној ћелији (137). Платина (IV) комплекси имају огроман потенцијал као антиканцерогени лекови у смислу високе активности и ниску токсичност. Око 3000 Pt (IV) комплекса су синтетисани и проучавани у покушају да се побољша антитуморска активност, нижа токсичност и да се самњи резистенција на њега. Само око 30 комплекса платине је ушло у клиничке студије (137, 138).

Генерално се верује да су Pt (IV) комплекси мање реактивни у реакцијама супституције лиганда. У односу на њихове Pt (II) аналоге, платина (IV) морају се свести на Pt (II) облик пре везивања за ДНК. По уласку у ћелију, постоје две метаболичких путева за Pt (IV) комплексе: редукција агенсима присутним у ћелији (глутатион, аскорбинска киселина) или директном интеракцијом са ДНК у једру. Први пут води до познатих интеракција Pt (II) комплекса, док други води формирању ковалентне везе између Pt (IV) и ДНК (137-139).

Мултинуклеарни комплекси платине (II) представљају трећу генерацију антитуморских лекова исто као платина (IV) комплекси (139, 140). Ови комплекси се састоје од два или три платинска центра који су повезани помоћу флексибилног моста као што је алифатични ланац (140, 141) или ригидног моста који се састоји од азолних молекула (142). Разлог за повећање интересовања за мултинуклеарне комплексе је њихова способност да се формира веза са ДНК који се разликују значајно од оних формирана цисплатином и сродним комплексима (141-143), што доводи до потпуно другачијег антитуморског понашања. Ови комплекси обично постоје у катјонским облицима у раствору и самим тим имају високу растворљивост у води; неки од њих су активни и код цисплатина остетљивих и код циспалтина резистентних ћелијских линија (144,145). За разлику од мононуклеарних комплекса, као што су цисплатина и клинички неактивна трансплатина, бинуклерани комплекси показују антитуморску активност (141,144,145). Како структура ДНК одређује поправку, активацију протеина и последичне ћелијске догађаје, разумевање њиховог формирања и биолошких последица је од суштинског значаја за даљи развој терапеутика.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је да се испита цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине и злата на ћелијским линијама карцинома плућа.

У складу са основним циљем постављени су следећи специфични циљеви.

1. МТТ тестом испитати потенцијалну цитотоксичност комплекса.
2. Испитати релативни однос некротичне и апоптотске смрти ћелија изазване ипитиваним комплексима.
3. Испитати да ли комплекси утичу на смањење већ успостављених метастаза карцинома плућа у мишјем моделу.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЋЕЛИЈСКЕ ЛИНИЈЕ

3.1.1. Хумане мезенхималне матичне ћелије

Хумане мезенхималне матичне ћелије (MSC) из периферне крви нам је љубазно обезбедила др Диана Бугарски (Институт за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Србија). Ова ћелијска култура се одржава у Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM са 10% FBS. Све ћелије су култивисане у инкубатору са температуром до 37 Ц, са процентом CO₂ од 5 %.

Залеђена крио-вајлица са 1 ml ћелијске суспензије је одлеђена и садржај је пребачен у епрувету са 9 ml комплетног медијума (Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM са 10% фетусног говеђег серума (Fetal bovine serum, FBS), 100 IJ/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина (Sigma Aldrich, Немачка) и центрифугиран 10 минута на 125 G. Супернатант је одливен, исталожене ћелије су ресуспендоване у 5 ml комплетног медијума и пребачене у Т-25 флак (BD Falcon, Сједињене Државе). Ћелије су гајене у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида, CO₂, у ваздуху 5%). Пошто ћелије постану субконфлуентне пресејаване су у нове флашкове у односу 1:3.

Хумане мезенхималне матичне ћелије (MSC) у четвртој пасажи су коришћене за све експерименте.

3.1.2. Ћелијска линија хуманог аденокарцинома плућа

A549 ћелије су ћелије алвеоларне базалне епителне ћелије из хуманог аденокарцинома плућа. Ову ћелијску линију је први развио D. J. Giard 1972. године са сарадницима, кроз уклањање и култивисање канцерогених ћелија плућног ткива у уклоњеном ткиву тумора 58-осмогодишњег белца оболелог од аденокарцинома плућа. A549 ћелије су купљене од фирме American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Култивисане су у DMEM медијуму који садржи 10% FBS, 100 IU/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина (Sigma Aldrich, Немачка).

Залеђена крио-вајлица са 1 ml ћелијске суспензије је одлеђена и садржај је пребачен у епрувету са 9 ml комплетног медијума DMEM са 10% FBS-а, 100 IU/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и центрифугиран 10 минута на 125 G. Супернатант је одливен, исталожене ћелије су ресуспендоване у 5 ml комплетног медијума и пребачене у T-25 флак (BD Falcon, Сједињене Државе). Ћелије су гајене у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида, CO₂, у ваздуху 5%). Пошто ћелије постану субконфлуентне пресејаване су у нове флашкове у односу 1:3.

A549 хуманог аденокарцинома плућа у трећој пасажи су коришћене за све експерименте.

3.1.3. Ћелијска линија мишијег карцинома плућа

Ћелијска линија мишијег карцинома плућа (Lewis Lung Cancer 1, LLC1) (3LL, H2b) је линија изведена из плућа C57BL миша коме је имплантиран Луисов (Lewis) карцином плућа. Набављена од American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Ћелије су биле рутински гајене у суспензији у T-25 флак (BD Falcon, Сједињене Државе) у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида, CO₂, у ваздуху 5%).

Обзиром да ове ћелије расту у суспензији, пресејаване су додавањем 10 ml комплетног медијума у флак који већ садржи 5 ml суспензије ћелија, а 15 ml разблажене суспензије је пресејано у 3 нова флашка по 5 ml. Комплетан медијум за гајење ових ћелија је био RPMI 1640 медијум (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) са 10% FBS, 100 IU/ml пеницилина, 100

мг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich chemical, Munich, Germany), и 2 mM глутамин (JRH Biosciences, Lenexa, KS).

LLC1 ћелије мишијег аденокарцинома плућа у трећој пасажи су коришћене за све експерименте.

3.2. СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ И ЗЛАТА

У овом истраживању коришћени су новосинтетисани динуклеарни комплекси платине (II), платине (IV) и злата.

3.2.1. Синтеза динуклеарних комплекса платине (II)

Комплекси $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиразин})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt1**), $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-4,4' -бипиридин})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{DMF}$ (**Pt2**) и $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**) су синтетисани према процедури коју је објавио Ридајк (Reedijk). (146) Као полазни комплекс за синтезу поменутих динуклеарних комплекса платине(II) коришћен је $trans\text{-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{DMF})](\text{ClO}_4)$.

3.2.1.1. Синтеза комплекса $trans\text{-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{DMF})](\text{ClO}_4)$

У раствор комплекса $trans\text{-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (0,1 g, 0,33 mmol) у 5 cm³ диметилформаида (DMF) додат је један еквивалент AgClO_4 (0,069 g, 0,33 mmol) такође у DMF. Тако добијени раствор је мешан преко ноћи у мраку и настали бели талог AgCl је процеђен кроз Millipore филтере. Настали раствор $trans\text{-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{DMF})](\text{ClO}_4)$ жуте боје је коришћен као полазни комплекс за синтезу динуклеарних комплекса платине(II).

3.2.1.2. Синтеза комплекса $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиразин})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt1**)

У раствор комплекса $trans\text{-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{DMF})](\text{ClO}_4)$ (0,145 g, 0,33 mmol) је додат у капима раствор мостног лиганда пиразина (0,013 g, 0,165 mmol) у DMF у односу 2 : 1 (комплекс :

мостни лиганд). Тако добијени раствор је мешан на собној температури 3 сата у мраку. После упаравања на вакуум упаривачу настали талог светло жуте боје је испран диетилетром, а затим остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,141 g (52,80%). Израчунато за $C_4H_{16}N_6Pt_2Cl_4O_8$: C, 5,94; H, 2,00; N, 10,40; Нађено: C, 6,38; H, 2,10; N, 9,95; 1H NMR (D_2O , 25 °C) δ (ppm) 2,0 (m, 2H, NH_2), 8,63 (m, 1H, CH, пиразин).

3.2.1.3. Синтеза комплекса [$\{trans-PtCl(NH_3)_2\}_2(\mu-4,4'$ -**бипиридин)](ClO₄)₂ · DMF (Pt2)**

У раствор комплекса $trans-[PtCl(NH_3)_2(DMF)](ClO_4)$ (0,145 g, 0,33 mmol) је додат у капима раствор мостног лиганда 4,4'-бипиридина (0,025 g, 0,165 mmol) у DMF у односу 2 : 1 (комплекс : мостни лиганд). Тако добијени раствор је мешан на собној температури 3 сата у мраку. После упаравања на вакуум упаривачу настали талог светло жуте боје је испран диетилетром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,220 g (69,64%). Израчунато за $C_{13}H_{27}N_7Pt_2Cl_4O_9$: C, 16,31; H, 2,84; N, 10,24; Нађено: C, 16,79; H, 2,80; N, 10,08; 1H NMR (D_2O , 25 °C) δ (ppm) 2,0 (m, 2H, NH_2), 2,93 (s, 1H, CH_3 , DMF), 7,28 (m, 1H, CH, 4-пиридин), 8,02 (s, 1H, CHO, DMF), 8,59 (m, 1H, CH, 4- пиридин).

3.2.1.4. Синтеза комплекса [$\{trans-PtCl(NH_3)_2\}_2(\mu-1,2$ -**бис(4-пиридил) етан)](ClO₄)₂ (Pt3)**

У раствор комплекса $trans-[PtCl(NH_3)_2(DMF)](ClO_4)$ (0,145 g, 0,33 mmol) је додат у капима раствор мостног лиганда 1,2-бис(4-пиридил)етана (0,030 g, 0,165 mmol) у DMF у односу 2 : 1 (комплекс : мостни лиганд). Тако добијени раствор је мешан на собној температури 3 сата у мраку. После упаравања на вакуум упаривачу настали талог светло жуте боје је испран диетилетром, а затим остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,195 g (64,78%). Израчунато за $C_{12}H_{24}N_6Pt_2Cl_4O_8$: C, 15,80; H, 2,65; N, 9,21; Нађено: C, 15,16; H, 2,71; N, 9,06; 1H NMR (D_2O , 25 °C) δ (ppm) 2,0 (m, 2H, NH_2) 2,88 (m, 2H, CH_2 , етан), 7,28 (m, 1H, CH, 4-пиридин), 8,59 (m, 1H, CH, 4- пиридин).

Комплекси $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ синтетисани су оксидацијом одговарајућих комплекса платине(II) помоћу H_2O_2 у киселој средини на $\text{pH} = 2,5$. (147, 148.)

3.2.2. Синтеза комплекса платине (IV)

3.2.2.1. Синтеза комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$

У водени раствор комплекса K_2PtCl_4 (0,1 g, 0,24 mmol) додат је један еквивалент лиганда 2,2'-бипиридина (bipy) (0,037 g, 0,24 mmol). Тако добијена суспензија је мешана на собној температури, 2 сата, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,089 g (88,2 %). Израчунато за $\text{PtCl}_2\text{N}_2\text{C}_{10}\text{H}_8$: C, 28,45; H, 1,91; N, 6,64; Нађено: C, 27,98; H, 1,87; N, 6,53.

3.2.2.2. Синтеза комплекса $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$

У водени раствор комплекса K_2PtCl_4 (0,1 g, 0,24 mmol) додат је један еквивалент лиганда 1,2-диаминциклохексана (dach) (0,027 g, 0,24 mmol). Тако добијена суспензија је мешана на собној температури, 2 сата, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,074 g (80 %). Израчунато за $\text{PtCl}_2\text{N}_2\text{C}_6\text{H}_{14}$: C, 18,98; H, 3,71; N, 7,37; Нађено: C, 18,66; H, 3,67; N, 7,35.

3.2.2.3. Синтеза комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$

Комплекс $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$ (0,089 g, 0,210 mmol) је растворен у 0,1 M NaCl на $\text{pH} = 2$ (0,01 M HCl) а затим је додат 2 cm³ 30 % H_2O_2 . Тако добијена суспензија је мешана на собној температури, 6 сати, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,068 g (66 %). Израчунато за $\text{PtCl}_4\text{N}_2\text{C}_{10}\text{H}_8$: C, 24,36; H, 1,64; N, 5,68; Нађено: C, 23,98; H, 1,76; N, 5,64.

3.2.2.4. Синтеза комплекса [Pt(dach)Cl₄]

Комплекс [Pt(dach)Cl₂] (0,074 g, 0,195 mmol) је растворен у 0,1 М NaCl на pH = 2 (0,01 М HCl) а затим је додат 2 cm³ 30 % H₂O₂. Тако добијена суспензија је мешана на собној температури, 6 сати, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,065 g (75 %). Израчунато за PtCl₄N₂C₆H₁₄: C, 15,98; H, 3,13; N, 6,21; Нађено: C, 15,68; H, 3,11; N, 6,18.

За синтезу комплекса платине(IV) су коришћени комплекси платине (II).

3.2.3. Синтеза комплекса злата

За синтезу изучаваних комплекса злата као полазна једињења коришћени су K[AuCl₄] (ABCR GmbH & Co. KG, Germany) и H[AuCl₄] (ABCR GmbH & Co. KG, Germany).

Нуклеофили INO, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His набављени су од Fluk-a и Acros Organics. Лиганди *terpy*, *bipy*, *dach*, *en*, SMC и DMSO набављени од Fluk-a, Acros Organics или Sigma Aldrich, коришћени су без предходног пречишћавања.

[Au(dien)Cl]Cl, [Au(terpy)Cl]Cl, [Au(bipy)Cl₂]Cl, [Au(en)Cl₂]Cl су синтетисани по раније публикованим поступцима (149,150). Чистоћа добијених једињења потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ¹H NMR спектроскопијом.

Једињења *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (Aldrich), D₂O (Deutero GmbH 99 %), Нерес пуфер {N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфидна киселина} (Aldrich) су такође коришћени без предходног пречишћавања.

Супституционе реакције [Au(dien)Cl]Cl, [Au(terpy)Cl]Cl, [Au(bipy)Cl₂]Cl, [Au(dach)Cl₂]Cl, [Au(en)Cl₂]Cl, [Au(SMC)Cl₂] и [AuCl₂(DMSO)₂]Cl комплексних једињења су изучаване у 25 mM Нерес пуферу. Нерес пуфер је изабран из разлога што је волуминознији молекул у односу на *tris* пуфер, па је везивање Нерес пуфера за јоне метала услед стерних сметњи потпуно искључено. (151) Сви водени раствори припремани су у бидестилованој води.

3.2.3.1. Синтеза [Au(dach)Cl₂]Cl комплекса

Као полазна супстанца у синтези комплекса коришћена је со K[AuCl₄]. Со злата најпре је растворена у малој количини воде (0,2g, 0,5 mmol). Лиганд *Dach* (0,2g, 0,5 mmol)

растворен је у смеси MeOH/H₂O (1:1, v/v) и додат у капима у раствор злато соли K[AuCl₄]. Реакциона смеша је мешана 5 часова на собној температури. Добијени жути раствор профилиран је и остављен у мраку да упарава. Настали жути кристали су профилирани, испрани хладном водом и осушени на ваздуху. Принос: 0,22 g (82 %). Израчунато за AuC₆H₁₄N₂Cl₃: H, 5,34; C, 13,80; N, 2,71. Нађено: H, 5,29; C, 13,66; N, 2,54%.

3.2.3.2. Синтеза [Au(SMC)Cl₂] комплекса

Као полазна супстанца у синтези комплекса коришћена је киселина злата HAuCl₄. Киселина HAuCl₄ (0,2g, 0,8 mmol) је најпре растворена у малој количини воде. У добијени раствор додат је лиганд S-метил-L-цистеин (0,105g, 0,8 mmol). Киселост раствора је подешена између 4 и 5 додатком 0,1 M раствора NaOH. Добијени раствор мешан је неколико часова, након чега је настали чисти раствор остављен да испарава у мраку на собној температури. Настали браон прах је профилиран, испран етанолом и сушен на ваздуху. Принос: 0,21 g (76 %).

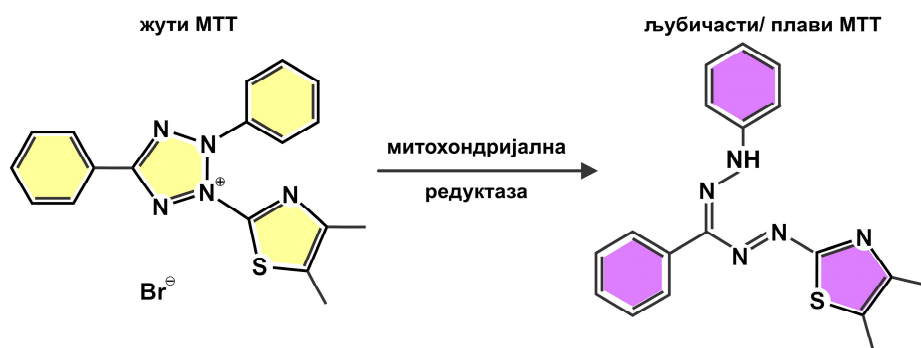
Израчунато за AuC₄SO₃H₁₁NCl₃: H, 3,07; C, 10,52; N, 3,07; S, 7,02. Нађено: H, 3,08; C, 10,73; N, 2,77; S, 7,01%.

3.3. Методе за испитивање цитотоксичних ефеката

За испитивање цитотоксичних ефеката новосинтетисаних комплекса платине (II), платине (IV) и злата коришћени су МТТ и LDH тест као и AnnexinV/PI тест за детекцију апоптозе.

3.3.1. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) тест

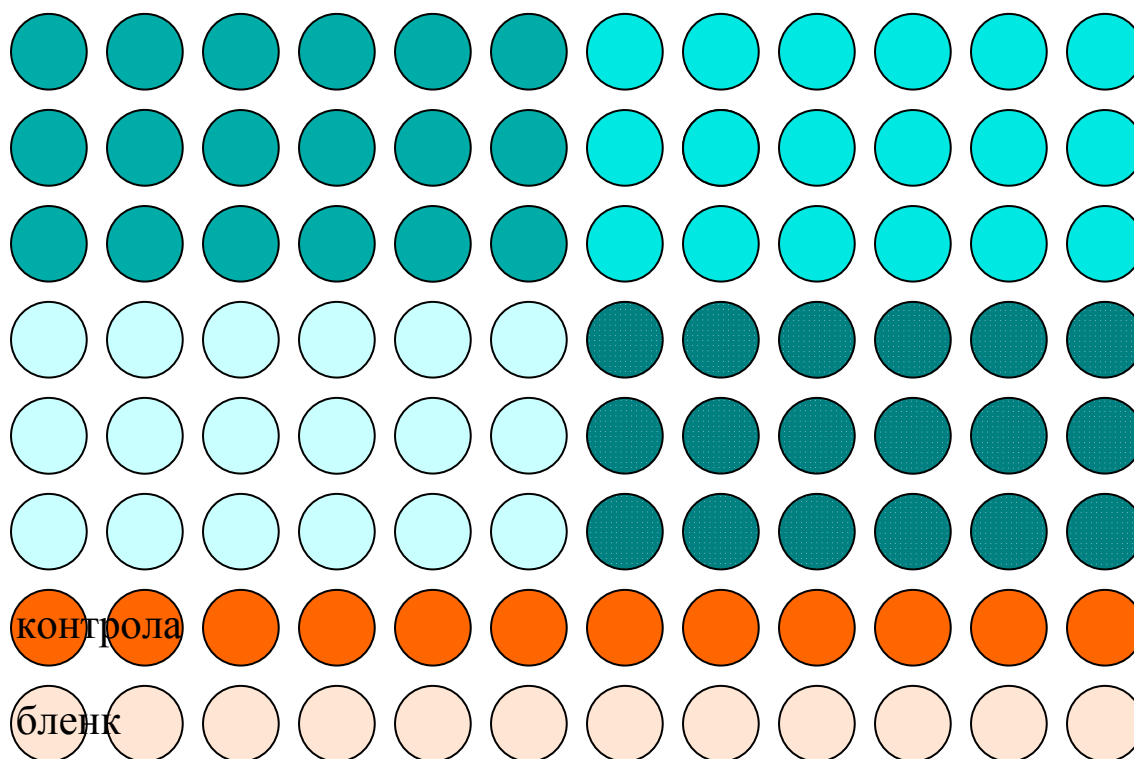
МТТ тест је метода којом се индиректно одређује вијабилност ћелија (1, 2). МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma Aldrich, Немачка), је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама се МТТ редукује до несолубилних љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија.



Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формазан се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 570 nm.

Утицај комплекса на вијабилност ћелија је одређиван МТТ тестом. Ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка на претходно описани начин и број је одређен коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија тј ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена (152). Ћелије су разблажене до густине $5 \cdot 10^4$ ћелија/ml. У микротитар плоче са 96 отвора је сипано 100 μ l (5.000 ћелија) суспензије по отвору. У

посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума, бленк. Плоча се преко ноћи инкубирала на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂. За 24 сата су се ћелије полепиле, па је медијум одливен и замењен са 100 µL комплекса раствореног у медијуму у одговарајућој концентрацији. За сваку концентрацију рађен је трипликат. У контролне отворе је поново сипан чист медијум. Плоча је инкубирана 24 или 72 сата под истим условима. За LLC1 ћелије је коришћен МТТ тест за суспензију ћелија. Истог дана су у микротитар плоче сипане ћелије (5000 по бунарчету у 100 µL медијума) и испитавани комплекси (раствор комплекса одговарајуће концентрације у комплетном медијуму, 100 µL по бунарчету).



Шема микротитар плоча за МТТ тест

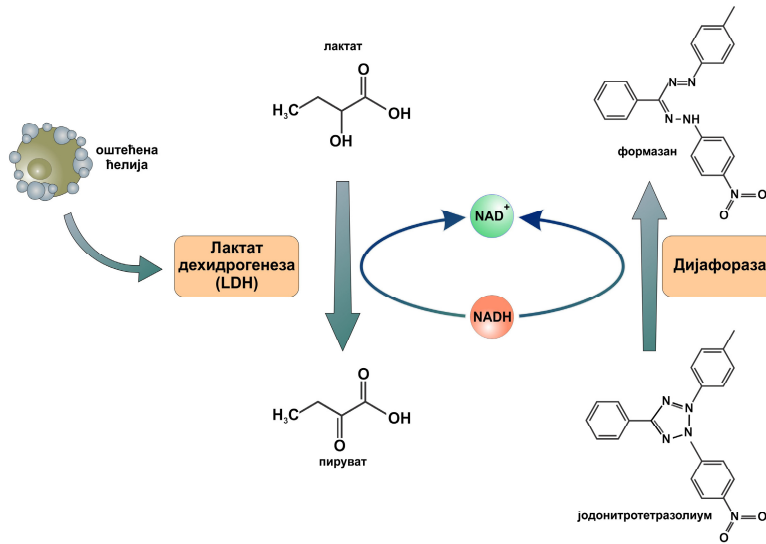
По истеку 24 или 72 сата, из свих бунарчића је уклоњена течност и додато је по 100 µl чистог DMEM-а са 15 % МТТ раствора (5 mg/ml у PBS-у, Phosphate buffer saline). Плоче су инкубиране још 2 до 4 сата. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки отвор је сипано по 150 µl диметил сулфоксида (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 µl глицинског пуфера (pH-10,5). Плоче су вортексоване до растварања кристала формазана и оптичка густина узорака је мерена мултифункционалним читачем микротитар плоча, Zenyth 3100. Процент вијабилних ћелија је израчунат на основу формуле:

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

(E-означава отвор са испитиваним супстанцама; B- бленк; K-отвор са нетретираним ћелијама.)

3.3.2. LDH (лактат дехидрогеназа) тест

LDH је стабилни ензим присутан у цитоплазми ћелија који се убрзо по оштећењу плазма мембране отпушта у медијум у којем се ћелије гаје. За испитивање оштећења ћелија узрокованог ГЈЦ коришћен је *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* (Roche Applied Science). Кит садржи мешавину супстрата која се додаје у супернатане испитиваних ћелија и активност LDH се одређује куплованом ензимском реакцијом којом се јодонитротетразолијум, INT, редукује до формазана, наранцасто-црвене боје, растворљивог у води.

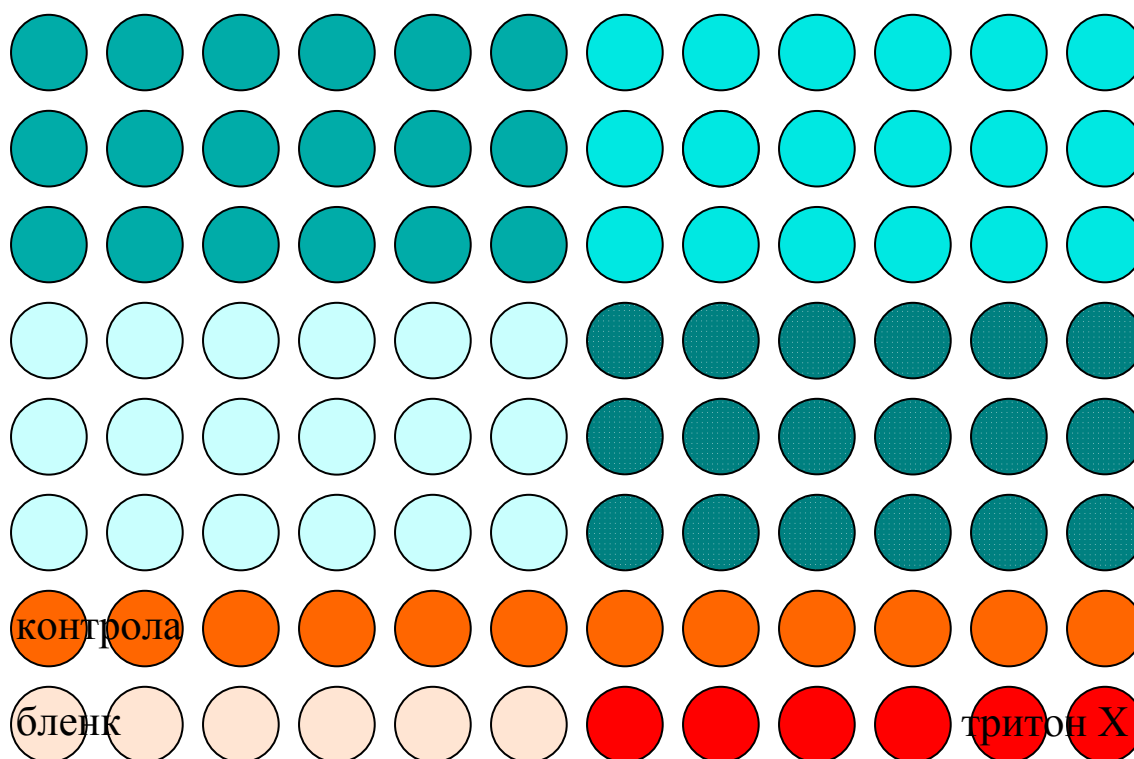


У првој ензимској реакцији LDH редукује NAD^+ до $\text{NADH} + \text{H}^+$ оксидацијом лактата до пирувата; а у другој реакцији *diaphorase* катализује пренос H/H^+ са $\text{NADH} + \text{H}^+$ на INT и тако настаје формазан. Кит садржи катализаторе (*diaphorase*/ NAD), лактат и INT.

Активност LDH ензима у супернатантима третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Пораст LDH активности директно корелира са количином створеног формаза па је интензитет боје директно пропорционалан броју мртвих ћелија. Интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 450 до 500 nm.

Ћелије су припремљене за LDH тест на исти начин као и за MTT тест, разлика је само у медијуму за култивацију који садржи 1% FBS-а због високе активности лактат дехидрогеназе у серуму. За LDH тест коришћене су 3 контроле:

1. активност ензима у самом медијуму, бленк;
2. спонтано ослобађање лактат дехидрогеназе из ћелија, ћелије су излагане само медијуму;
3. максимално ослобађање лактат дехидрогеназе из одређеног ћелијског типа, ћелије су третиране 1% тритоном X који изазива пермеабилizацију ћелијске мембране.



Шема микротитар плоча за LDH тест

После 24 сата излагања ћелија испитиваним комплексима, супернатант је покупљен и пребачен у нове микротитар плоче. У 100 μl супернатанта је додато по 100 μl радног раствора LDH кита. Плоче су држане 30 минута у мраку на собној температури, а затим је у сваки отвор микротитар плоче додато по 50 μl 1N хлороводоничне киселине. Оптичка густина узорака је мерена на 450 nm на Zenyth 3100 мултифункционалном читачу. Процент мртвих ћелија је израчунат на основу формуле:

$$\% \text{ мртвих ћелија} = \frac{(E-B)}{((T-B)-(K-B))} \times 100;$$

(E-означава отвор са испитиваним супстанцама; Б- бленк; Т- отвор са ћелијама третираним третитоном X; К-отвор са нетретираним ћелијама).

3.3.3. Тест за детекцију апоптозе (AnnexinV/PI)

Апоптозу карактерише транслокација фосфатидил серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Annexin V-FITC је флуоресцентна проба која се везује за фосфатидили серин, изложен на ћелијској мембрани. Пропидијум јодид, PI се везује за ДНК присутну у ћелији само уколико је интегритет ћелијске мембране нарушен. Сматра се да су Annexin V (-); PI (-) ћелије живе, annexin V (+); PI (-) ћелије су у раним фазама апоптозе и Annexin V (+); PI (+) су у касним фазама апоптозе (153). У експоненцијалној фази раста су ћелије пресејане на 9 нових фласкова. Када су ћелије прекриле 70% дна флашка, медијум је замењен медијумом са додатком испитиваног комплекса у одговарајућој концентрацији. Контролне ћелије нису излагане комплексима, медијум је замењен свежим комплетним медијумом. Након 24 сата изложености комплексима ћелије су поклопене из фласкова, опране 2 пута у комплетном медијуму и ресуспендоване у пуферу који омогућава везивање Annexin-a V (10X пуфер: 0.1 М HEPES, pH 7.4; 1.4 М NaCl; 25 mM CaCl₂) до густине 1.000.000 ћелија/ml. У 100 µl такве суспензије додато је по 5 µl Annexin-a V (BD Pharmingen, Сједињене Државе) и 5 µl PI (50 µg/ml PBS-a) (Sigma Aldrich, Немачка). После истека 15 минута инкубације на собној температури и у мраку, додато је по 400 µl 1X пуфера за везивање. Анализирано је 20000 догађаја на Facscalibur BD проточном цитометру, а подаци су обрађени у Winmdi 2.9 програму.

3.4. Методе за испитивање антитуморске активности комплекса *in vivo*

3.4.1. Лабораторијске животиње

Ова студија је изведена на мишевима чистог соја C57BL/6 ("wild type") који су одгајани у виваријуму Медицинског факултета у Крагујевцу.

У појединачним експериментима коришћени су увек мишеви истог пола и врло блиске старости (разлика у старости није била већа од 7 дана). Мишеви коришћени у истраживањима су били старости од 6 до 8 недеља.

За експерименте на лабораторијским животањама претходноје добијена сагласност Етичког комитета за рад на лабораторијским животињама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.4.2. Индукција експерименталних метастаза

LLC1 ћелије мишијег аденокарцинома плућа су гајене у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида, CO₂, у ваздуху 5%). Обзиром да ове ћелије расту у суспензији, пресејаване су додавањем 10 ml комплетног медијума у флак који већ садржи 5 ml суспензије ћелија, а 15 ml разблажене суспензије је пресејано у 3 нова флака по 5 ml. Комплетан медијум за гајење ових ћелија је био RPMI 1640 медијум (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) са 10% FBS, 100 IU/ml пеницилина, 100 µг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich chemical, Munich, Germany), и 2 mM глутамин (JRH Biosciences, Lenexa, KS). LLC1 ћелије мишијег аденокарцинома плућа у трећој пасажи су коришћене за све *in vivo* експерименте.

Непосредно пре интравенске инокулације, вијабилност туморских ћелија смо одредили помоћу трупан-blue-a и само ону ћелијску суспензију која садржи више од 95% вијабилних ћелија смо користити за апликацију.

Да бисмо индуковали експерименталне метастазе интравенски смо апликовали 5×10^4 LLC1 ћелија ресуспендованих у 200 µl DMEM-а. Овај број ћелија је претходно наведен у ранијим студијама (154), а оптимизован у нашим предекспериментима.

Мишеви су били подељени у 3 експерименталне групе и 1 контролну групу, а сваку групу је чинило минимум по 25 мишева.

I експериментална група: мишеви су 1. дана експеримента примили интравенски 5×10^5 LLC1 ћелија у репну вену

II експериментална група: почевши од 10. дана након апликације туморских ћелија, мишевима су три пута недељно апликовани испитивани комплекси.

III експериментална група: почевши од 10. дана након апликације туморских ћелија, мишевима је три пута недељно апликован комплекс цисплатине.

Контролна група: мишеви су од 1. дана експеримента примали интравенски физиолошки раствор, увек када је мишевима из експерименталне групе апликован испитиван комплекс или цисплатина.

Све супстанце мишеви су примали 3 пута недељно у дози од 0,10404 мг PtEn и 0,10404 мг CysPt, одређеној на основу *in vitro* испитивања.

Мишеви су били жртвовани 21. дана експеримента а на основу података из ранијих студија (155), и наших предексперимената.

3.4.3. Патохистолошка анализа метастаза

Двадесет првог дана после убризгавања туморских ћелија, сви мишеви су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром (BETA NEM, Београд) и изолована су им плућа за патохистолошку анализу метастатских колонија. Још приликом изолације органа, на плућима неких мишева су макроскопски уочене карактеристичне метастатске промене црне боје (макрометастазе).

3.4.4. Фиксација и дехидратација поступком смрзавања ткива

У нашем истраживању је примењена техника смрзнутих резова. Овакав поступак има своје предности: брз је, јер нема класичне фиксације ни осталих хемијских поступака. Поступком смрзавања ткива на температури од -25°C постиже се истовремена фиксација и дехидратација. Техника је погодна како за класична бојања тако и за хистохемијске и имунохистохемијске технике бојања. Недостатак методе су оштећења ткива која стварају кристали леда.

Непосредно након изолације различитих органа, узорци ткива су замрзнути на температури од -25°C , а затим фиксирани на подлоге (дрвене плочице) и сечени микротомом на серијске пресеке дебљине 5-10 μm . За патохистолошку анализу су коришћени ткивни пресеци са три нивоа на међусобном растојању од 25 μm (од сваког миша су анализирана по 3 ткивна исечка и то сваки 5-и ткивни пресек).

3.4.5. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Уследило је бојење криостатских ткивних пресека методом хематоксилин-еозин (hematoxylin-eosin) по Heidenhain-у и сагласно препорукама Gurr-a(156): на почетку су плочице са ткивним пресецима пуферисане у пуферу формалдехида 10 секунди, онда опране у текућој води а затим потопљене. 2 минута у Mayer-ов хематоксилин (Merck). Потом су ткивни исечци испирани 1 минут у текућој води и најзад су бојени алкохолним еозином (Merck) у трајању 1 минут. Након бојења уследила је дехидратација исечака како би се у њима уклонила вода. Другим речима, исечци су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре 1 минут у 85%-тном алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96%-тном и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просветљавања када су исечци потпљени 50 секунди у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају смо на ткивне исечке наносили Канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Србија) и прекрили их покровним стаклима. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом након 24-часовног сушења.

3.4.6. Верификација броја и величине метастатских колонија

Двадесет првог дана после убризгавања туморских ћелија мишеви су жртвовани а исечци плућа, јетре и мозга су обојени H&E-ом. Метастазе су верификоване микроскопирањем (увеличање 10X и 40X) само у плућима и то као метастатске колоније са карактеристичном браон-црном пигментацијом и као метастатска "жаришта" са увећаним вишеједарним ћелијама јасно ограничена од околног плућног ткива.

3.4.7. Изолација спленоцита

Мишеви из експерименталних и из контролне групе су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром двадесет првог дана после интравенског убризгавања 5×10^4 LLC1 ћелија у 200 μ l DMEM-а. Свим мишевима је изолована слезина а затим је читав поступак изолације спленоцита изведен на леду (на $+4^\circ\text{C}$) и то на следећи начин: најпре смо клипом шприца хомогенизовали слезину и пропустили је кроз ћелијско сито (cell strainer BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50 ml уз додавање 5 ml медијума (RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH) са додатком 10% FBS-а). Овако развојене појединачне ћелије су центрифугиране на 1500 rpm 5 минута а онда је одливен супернатант. У циљу лизирања еритроцита уследила је инкубација ћелија у 5 ml lysing раствора у трајању 5 минута такође на леду. Након истека инкубације додавањем 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом је заустављено даље лизирање. Затим смо ћелије центрифугирали, одлили супернатант и после додавања 8 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом добро ресуспендовали пипетом. Како бисмо избегли контаминацију спленоцита хистиоцитима слезине, ћелије смо још једном пропустили кроз ћелијско сито. На тај начин смо добили суспензију појединачних спленоцита коју смо користили у даљим испитивањима (за проточну цитофлуорометријску анализу).

3.4.8. Проточна цитофлуорометријска анализа популација мононуклеарних ћелија слезине

У овој туморском моделу је између осталог примењена и проточна цитофлуорометрија како би се одредила релативна заступљеност ћелија специфичне и неспецифичне имуности одговорних за антитуморску имуност: Natural killer (NK), NKT, CD8+ цитотоксичних лимфоцита као и CD4+ Т лимфоцита и макрофага у слезини мишева експерименталних и контролне групе. Анализа је рађена из свеже изолованих спленоцита. Након изолације, приликом бројања спленоцита је одређивана и њихова вијабилност помоћу trypan-blue-а под светлосним микроскопом и у свим експериментима вијабилност ћелија је износила између 90% и 95%.

3.4.8.1. Бојење мембранских маркера

У техници бојења мембранских маркера за фенотипизацију популација мононуклеарних ћелија слезине су примењена анти-мишија моноклонска антитела различите специфичности (Табела 1).

Табела 1. Примарно конјугована моноклонска антитела за проточну цитометрију

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Разблажење	Произвођач
F4/80	PE	CI:A3-1	IgG _{2b} ,κ	1:100	BioLegend
CD8a	Alexa Fluor® 488	53-6.7	IgG _{2a} ,κ	1:100	BD Pharmingen
CD4	Alexa Fluor® 488	RM4-5	IgG _{2a} ,κ	1:100	BD Pharmingen
CD3e	Alexa Fluor® 488	145-2C11	IgG1, κ	1:100	BD Pharmingen
NK1.1	APC	PK136	IgG _{2a} , κ	1:100	eBioscience

Процедура бојења површинских маркера је изведена на следећи начин: На 1×10^6 спленочита ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. Staining Buffer; BD) додата је одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела обележених различитим флуоресцентним бојама у одређеним комбинацијама: Alexa Fluor® 488-анти-CD3e антитела; PE-F4/80 и Alexa Fluor® 488-анти-CD8a антитела; Alexa Fluor® 488-анти-CD4 антитела; APC-анти- NK1.1.

Спленицити су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 2). Бојење изотипским контролама помаже нам да разграничимо специфично од неспецифичног бојења.

Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле коришћени су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији спленочита ($V \approx 80 \mu$ l) буду 1:100. Затим је талог ћелија са антителима краткотрајно вортексован и онда је уследила њихова инкубација у мраку на температури од $+4^\circ\text{C}$ у трајању 20 минута. По истеку инкубације, ћелије су "опране" додавањем 1.5 ml хладног пуфера за бојење (енгл. Staining

Buffer, BD) и онда су центрифугиране 5 минута на 2000 грм. Потом је одливен супренатант и талог ћелија је ресуспендован у 350µl пуфера за бојење. Анализирано је 20000 догађаја на FacsCalibur BD проточном цитометру, а подаци су обрађени у WinMDi 2.9 програму.

Табела 2. Изотипске контроле

Назив антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач
Hamster Isotype Control	Alexa Fluor® 488	A19-3	IgG1 κ	BD Pharmingen
Hamster Isotype Control	PE	B81-3	IgG2a κ	BD Pharmingen
Rat Isotype Control	Alexa Fluor® 488	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen
Rat Isotype Control	APC	R35-95	IgG2a κ	BD Pharmingen

3.4.8.2. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво смо испитали правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Вредности су имале правилну расподелу па смо користили параметарски Student's-ов t тест. Резултати експеримента су изражени као вредност ± стандардна грешка (SE). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматра се када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

4. РЕЗУЛТАТИ

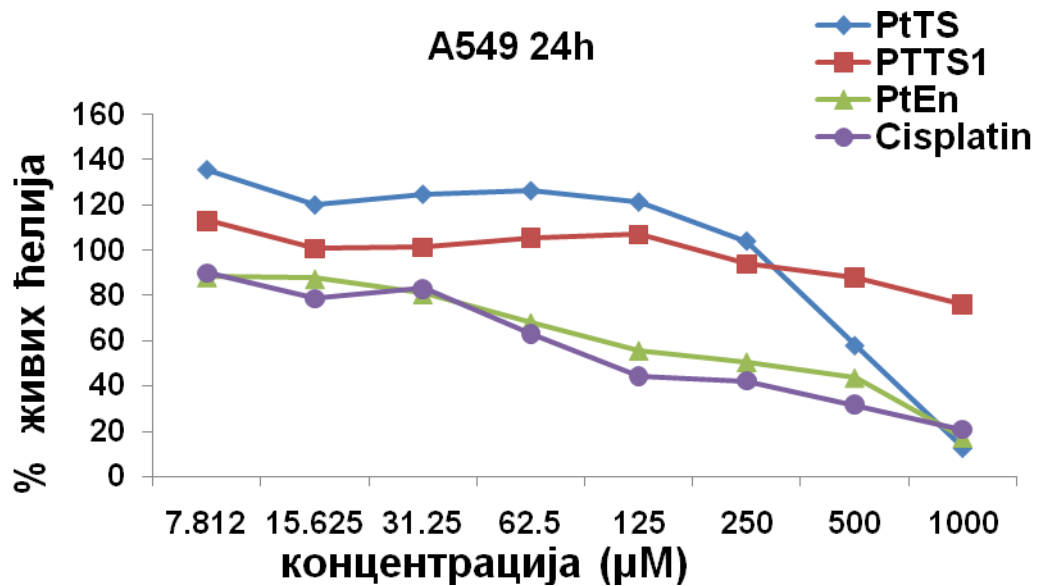
4.1. Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијску линију хуманог карцинома плућа A549 *in vitro*

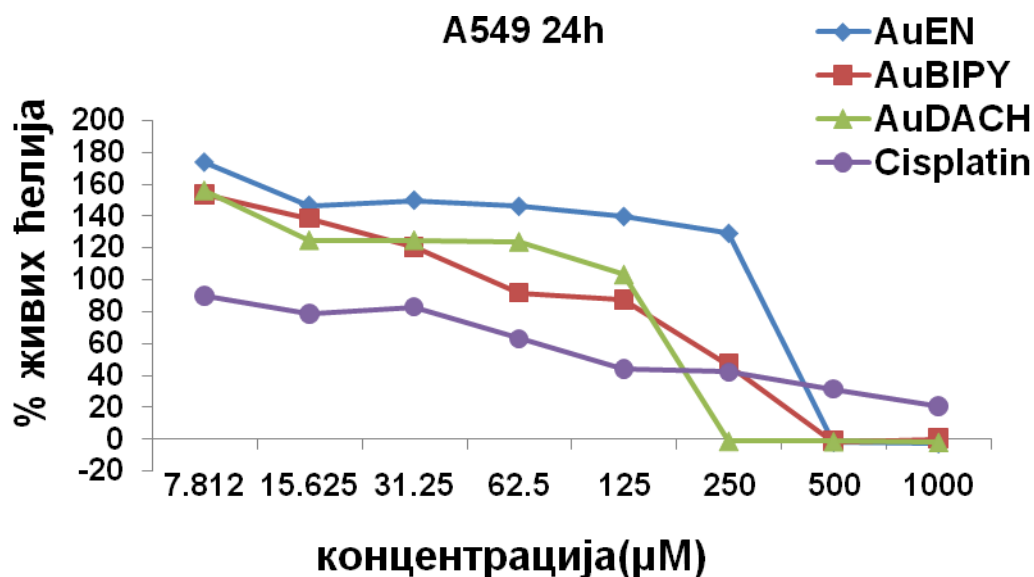
Цитотоксички ефекат комплекса платине и злата на хуману ћелијску линију карцинома плућа испитиван је коришћењем МТТ и LDH теста. Као контролна ћелијска линија, тј туморски неизмењене ћелије које се брзо деле коришћене су хумане мезенхималне матичне ћелије изоловане из периферне крви (MSC). У овим експериментима испитивана је временски и дозно зависна цитотоксичност. A549 ћелијска линија је култивисана 24 и 72 сата у двоструко растућим разблажењима комплекса почетне концентрације 1000 μM , а цитотоксичност је утврђивана МТТ и LDH тестовима цитотоксичности. Резултати оба МТТ теста указују да су сви испитани комплекси цитотоксични за A549 при чему је регистрована статистички значајна разлика у цитотоксичности испитиваних комплекса злата и платине.

4.1.1. Резултати МТТ теста

МТТ тест је показао дозну зависност ефеката испитиваних комплекса. Цитотоксичност комплекса злата и платине расте са порастом концентрације и након 24 сата излагања испитиваним комплексима (Графикон 1) а и после 72 сата култивације са комплексима (Графикон 2). Једино PtEn и Cisplatin испољавају цитотоксичност и у најмањим концентрацијама 7,8 μM после 24 сата, а остали комплекси имају цитотоксички ефекат у нешто већим концентарцијама, Au VIPY почев од концентрације 31,25 μM ; а PTTS, PTTS1 и AuDACH од 250 μM . Као што се види на графику мање концентрације комплекси платине су токсичнији за A549 у поређењу са комплексима злата. Најактивнији од свих испитиваних комплекса је PtEn који након 24 сата култивације са A549 има врло сличну

цитотоксичност као и цисплатина. PTTS и PTTS1 имају мању активност у поређењу са цисплатином у свим испитиваним концентрацијама. Међутим ако се посматрају ефекти комплекса злата уочава се да су сви комплекси мање активни од цисплатине у мањим концентарцијама а да у већим концентрацијама (AuDACH-250 μM ; AuBIPY и AuEn-500 μM) испољавају већу цитотоксичност него цисплатина, односно убијају 100% A549 ћелија.

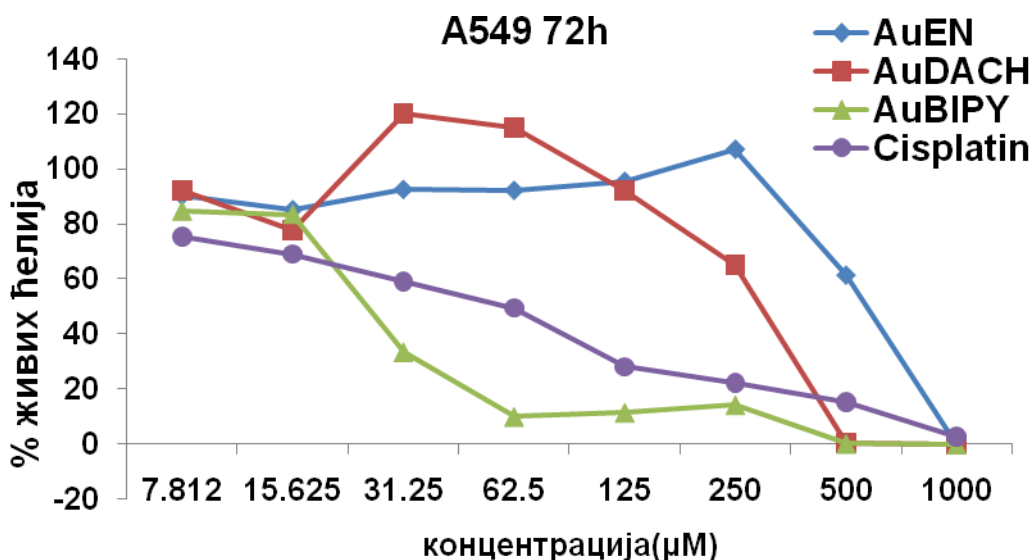
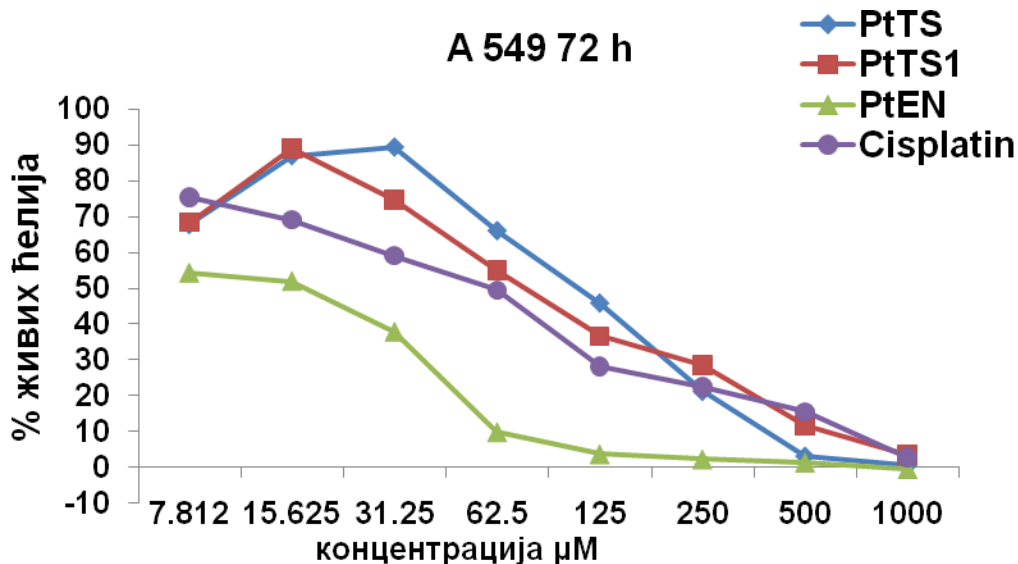




Графикон 1: Цитотоксичност комплекса злата и платине на хуманој линији карцинома плућа A549 после 24 сата излагања (мерено МТТ тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) 3 понављања, а сваки од експеримента је рађен у трипликату.

Ако се посматра цитотоксичност комплекса након 72 сата уочава се повећање цитотоксичности свих испитиваних комплекса платине. PtTS и PtTS1 након 72 сата имају врло сличну, а PtEn знатно већу цитотоксичност него цисплатина. PtEn након 72 сата убија око 50% A549 ћелија и у најмањој испитиваној концентрацији 7,8 µM.

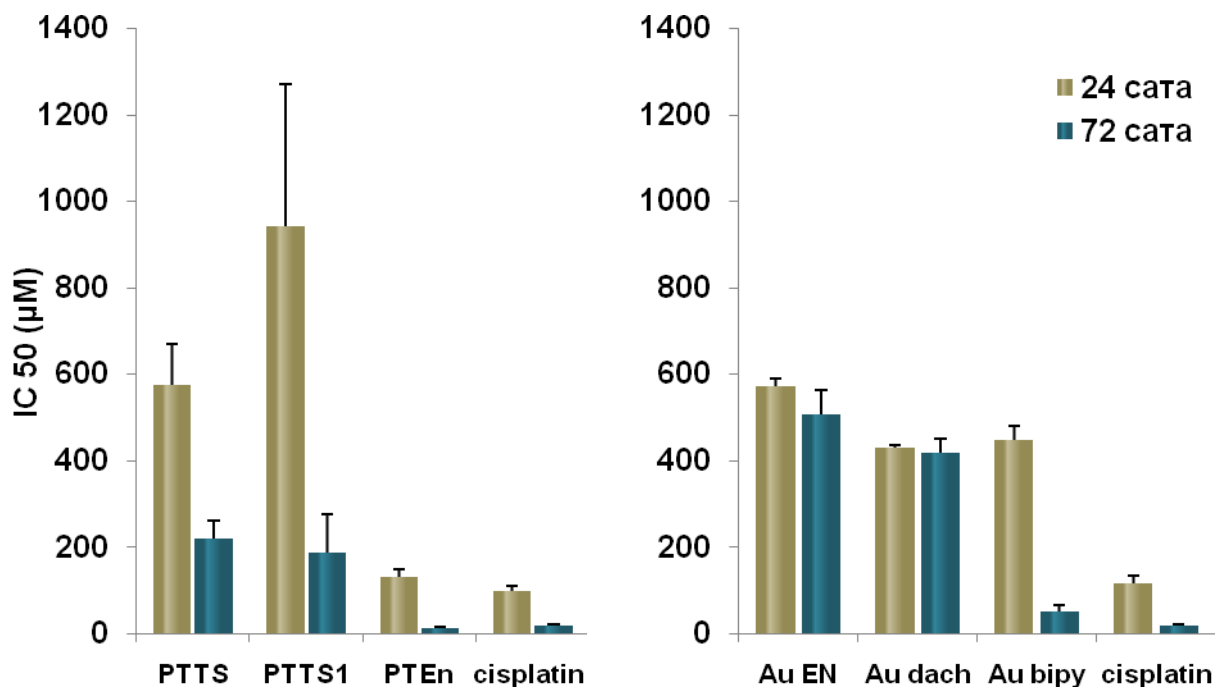
Резултати добијени након излагања туморских ћелија комплексима злата су нешто другачији. Цитотоксичност комплекса AuEn и AuDACH се готово није променила са повећањем времена излагања. Међу испитиваним комплексима, Комплекс AuBIPY показује већу цитотоксичност од цисплатине у свим испитиваним концентрацијама.



Графикон 2: Цитотоксичност комплекса злата и платине на хуманој линији карцинома плућа A549 после 72 сата излагања (мерено МТТ тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) 3 понављања, а сваки од експеримента је рађен у трипликату.

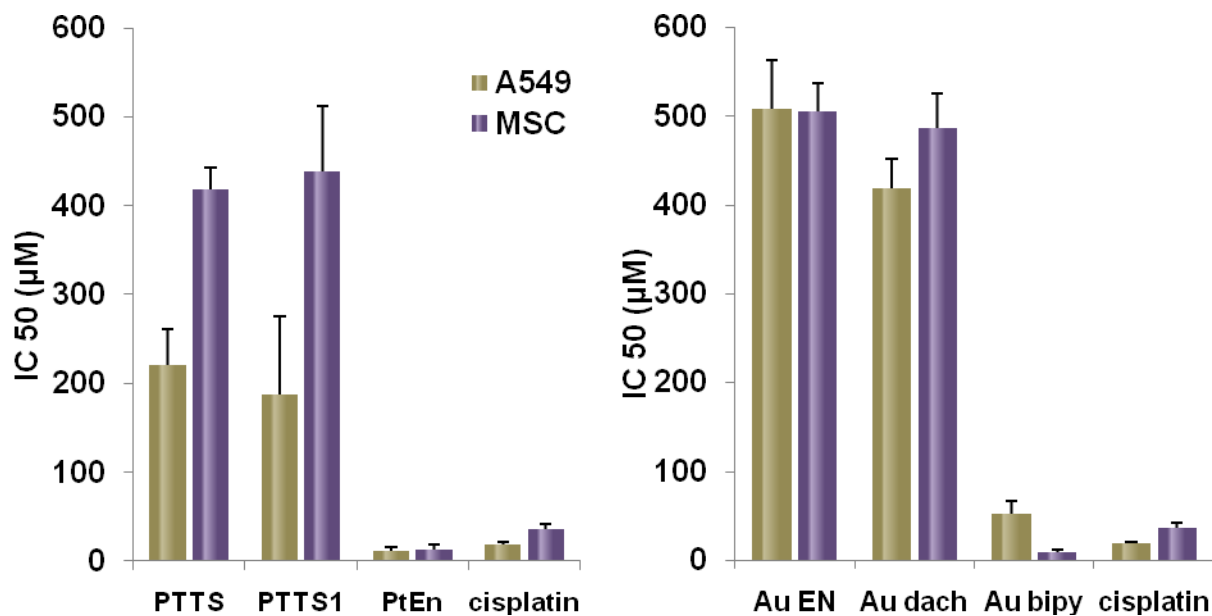
Сумарна цитотоксична активност комплекса платине и злата кроз IC50 вредности тј вредности концентрација које убијају 50% испитиваних ћелија је приказана на графикону 3. И кроз IC50 вредности се уочава повећање цитотоксичне активности комплекса платине са повећањем дужине излагања ћелија, док се међу испитиваним комплексима злата са

повећањем дужине излагања повећава цитотоксичност само AuVIPY. IC50 вредности PTTS и PTTS1 су статистички значајно веће у поређењу са IC50 цисплатине, односно цитотоксичка активност ова два комплекса је статистички значајно мања у поређењу са активносћу цисплатине и након 24 и након 72 сата излагања комплексима. Нема статистички значајне разлике у IC50 вредностима између PtEn и цисплатине. Вредности IC50 за сва три комплекса злата су статистички значајно веће у поређењу са овом вредношћу за цисплатину након 24 сата излагања A549 комплексима, али се са повећањем дужине излагања ћелија комплексима губи статистичка значајност између AuVIPY и цисплатине.



Графикон 3: IC50 вредности за комплексе злата и платине за хуману линију карцинома плућа A549 после 72 сата излагања (мерено МТТ тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) 3 понављања, а сваки од експеримента је рађен у трипликату.

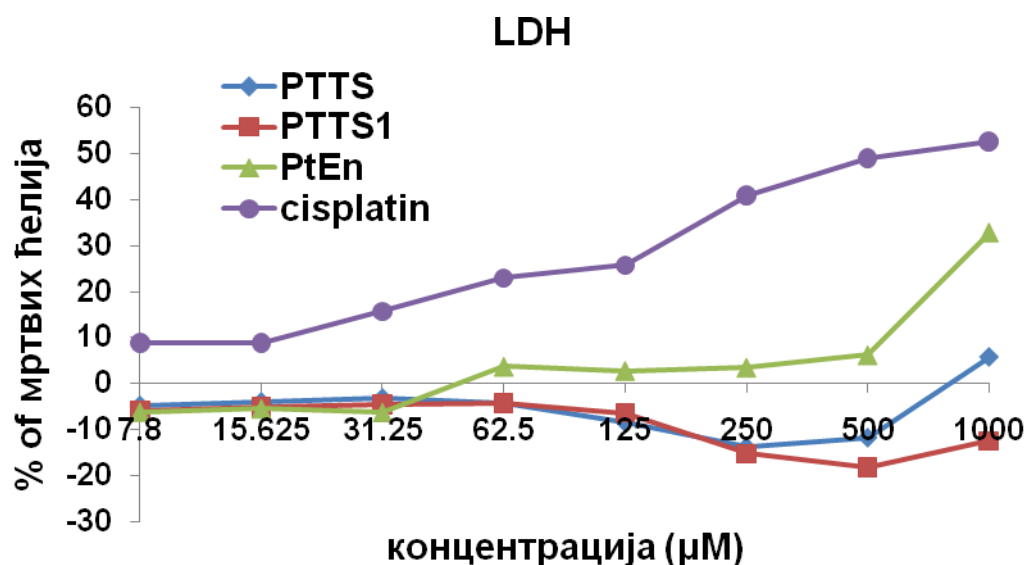
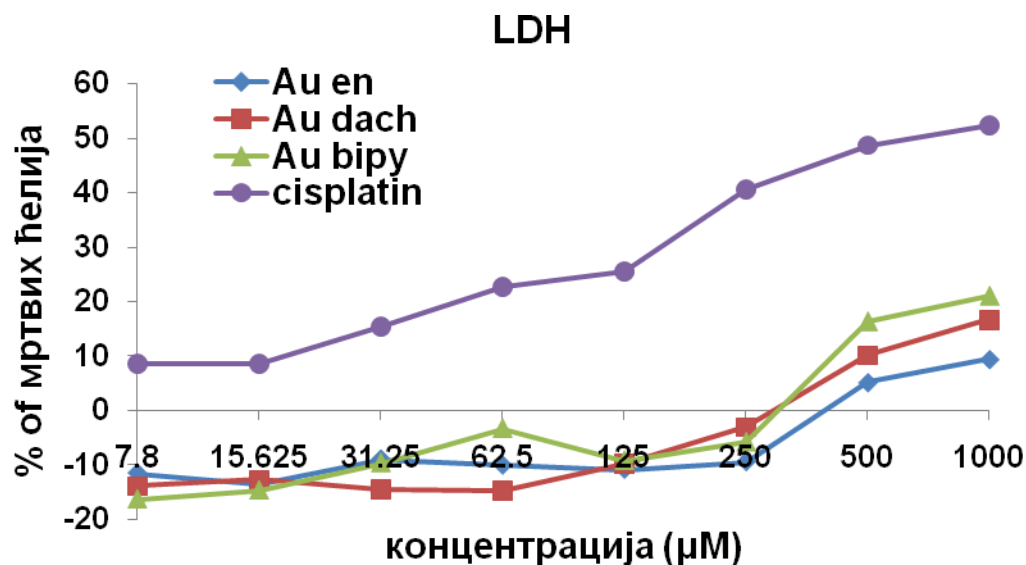
Поређењем цитотоксичке активности испитиваних комплекса на ћелијама карцинома и мезенхималним матичним ћелијама које се деле брзо слично као и туморске али су туморски неизмењене (Графикон 4) уочава се да комплекси злата и PtEn, као и цисплатине имају веома сличан цитотоксички ефекат и на ћелије карцинома плућа и на мезенхималне матичне ћелије. Једино PTTS и PTTS1 имају статистички значајно мањи цитотоксички ефекат на хумане мезенхималне матичне ћелије него на туморске ћелије (IC50 вредности ових комплекса за MSC су значајно већи него за A549). Овај налаз указује да би ова два комплекса могла да имају мање штетне ефекте уколико би се применила *in vivo*.



Графикон 4: Поређење цититксичке активности комплекса платине и злата на хуманим линијама карцинома плућа A549 и мезенхималних матичних ћелија. Приказане су IC50 вредности комплекса за обе линије након 72 сата излагања испитиваним комплексима (мерено МТТ тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) 3 понављања, а сваки од експеримента је рађен у трипликату.

4.1.2. Резултати LDH testa

LDH тест након 24 сата излагања комплексима је, као и МТТ тест, показао да се самањењем концентрације комплекса смањује и њихова цитотоксичност (Графикон 5). Резултати LDH теста се донекле и разликују у односу на резултате МТТ теста. LDH тестом је показано да и комплекси злата као и комплекси платине испољавају цитотоксичку активност само у већим концентрацијама (500 и 1000 μM). PTTS и PTTS1 чак ни у концентрацији 1000 μM не убијају A549 ћелије мерено LDH тестом. Такође сви испитивани комплекси испољавају мању цитотоксичку активност него цисплатина. Разлика у резултатима добијеним МТТ и LDH тестом може да се објасни различитим принципима на којима су ова два теста заснована. МТТ тестом се мери активност митохондријалних ензима која указује на присуство вијабилних ћелија.



Графикон 5: Цитотоксички ефекат комплекса злата и платине на A549 након 24 сата (мерено LDH тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) + стандардна грешка (SE) (3 експеримента са 3 понављања).

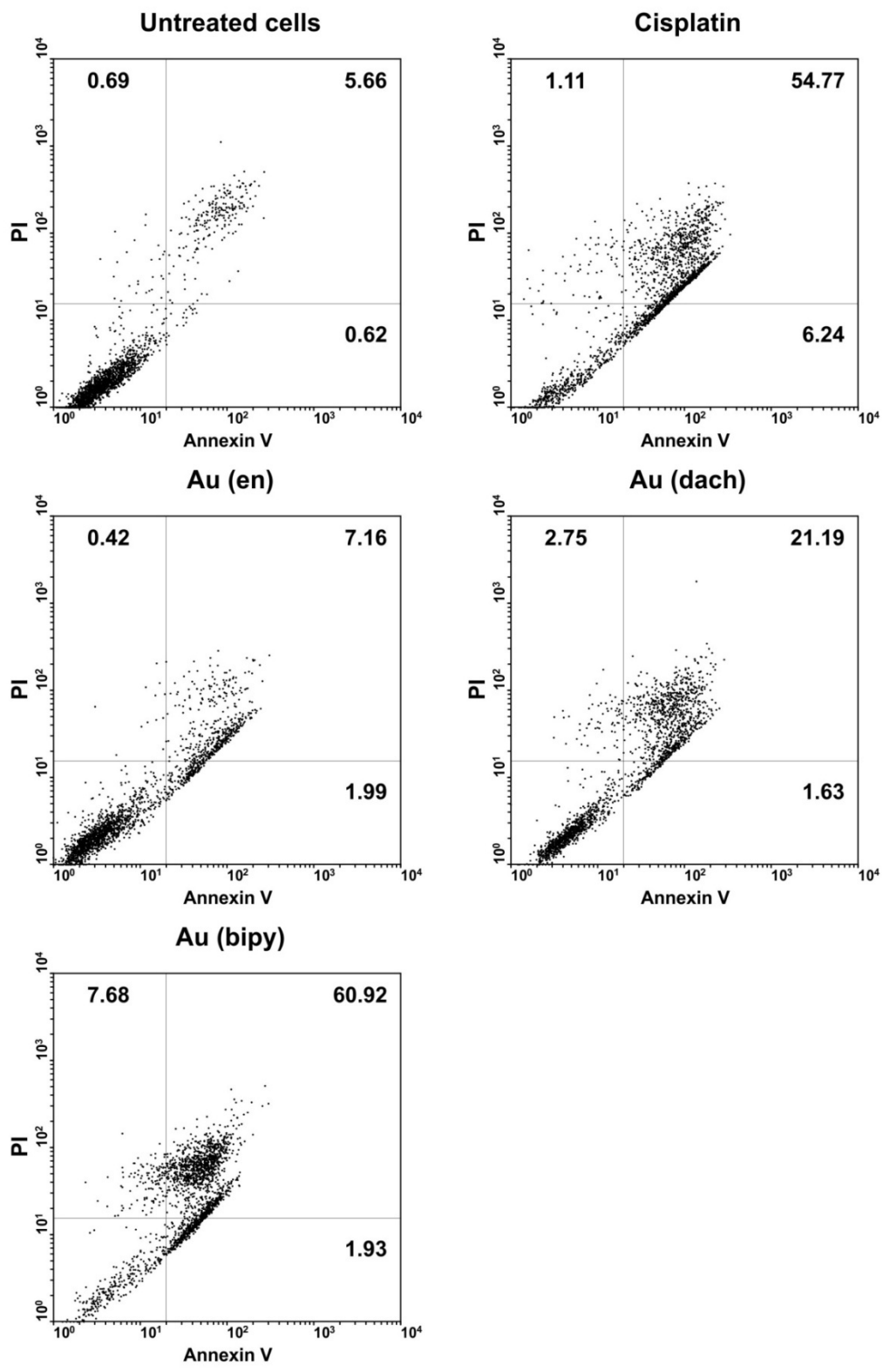
LDH тестом се мери активнос ензима лактат дехидрогеназе у медијуму у којем су ћелије култивисане. Овај ензим је присутан у цитоплазми ћелија и излази из ћелија тек након лизе ћелијске мембране, тако да се LDH тестом више мери некротска смрт ћелија или проценат ћелија у касним фазама апоптозе када већ почиње да се дезинтегрише ћелијска мембрана. Са друге стране MTT тест може да одражава fine промене активности

митохондријалних ензима које се јављају рано у процесу апоптозе па би овим тестом требало да се рано детектују цитотоксички ефекти испитиваних супстанци.

Према томе претходни резултати би могли да укажу да сви испитивани комплекси пре свега изазивају апоптотску смрт А549 ћелија што смо и потврдили проточном цитометријом.

4.1.3. Сви испитивани комплекси злата и платине индукују апоптотску смрт ћелијске линије хуманог карцинома плућа А549

Тест апоптозе је показао да сви испитивани злата индукују апоптотску смрт А549 ћелија. (Графикон 6). Двадесетчетри сата након излагања комплексима злата (концентрација 500 μ М) већина мртвих ћелија је у касној апоптози (AnnexinV+PI+ ћелије). Најтоксичнији ефекат на А549 ћелије је испољио Au бису (60,92% касно апоптотичних ћелија), токсичнији него цисплатина (54,77% касно апоптотичних ћелија). Процент А549 ћелије третиране комплексом Auен у касној апоптози (7,16%) скоро да се не разликује од процента А549 ћелија које су спонтано ушле у апоптозу (5,66%). Проенти мртвих А549 ћелија мерено тестом апоптозе су мањи у потређењу са процентима мртвих ћелија мерено МТТ тестом, али и овај налаз може да указује да су МТТ тестом забележене почетне промене у метаболизму митохондрија које могу да индукују апоптозу ћелија па су и проценти мртвих ћелија овако мерених већи у односу на проценат мртвих ћелија мерено тестом апоптозе јер се овим тестом детектују промене на ћелијској мембрани које прата апоптозу, а које се вероватно дешавају касније у односу на промене метаболизма митохондрија.



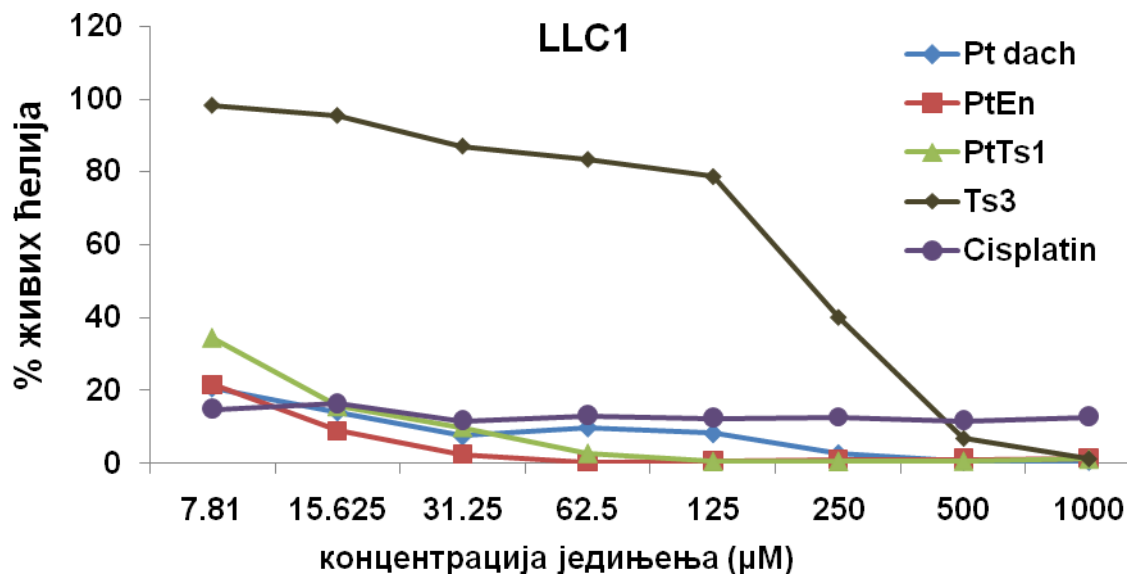
Графикон 6: Репрезентативни dot-plot-ови A549 ћелија тертираних испитиваним комплексима и цисплатином (концентрације 500µM) обојених анексином и пропидијум јодидом.

4.2. Комплекси платине су цитотоксичнији од цисплатине за ћелијску линију мишјег карцинома плућа LLC1 *in vitro*

С обзиром да је показано да су испитивани комплекси платине испољили снажнији цитотоксички ефекат на А549 ћелије у поређењу са ефектима комплекса злата даље смо испитивали цитотоксички ефекат комплекса платине на ћелије мишјег карцинома плућа LLC1. Није забележена значајна разлика у цитотоксичким ефектима PTTS и PTTS1 па је у наредним експериментма коришћен само PTTS. Испитивана су и два нова комплекса платине TS3 и Ptdach. Дозна зависност цитотоксичких ефеката комплекса платине на LLC1 ћелије је испитивана коришћењем МТТ и LDH теста након 24 сата излагања комплексима. LLC1 ћелијска линија је култивисана 24 сата у двоструко растућим разблажењима комплекса почетне концентрације 1000 μM . Резултати оба теста указују да сви испитани комплекси испољавају изражен цитотоксички ефекат на LLC1.

4.2.1. Најслабији цитотоксички ефекат на LLC1 ћелије испољава TS3 мерено МТТ тестом

МТТ тест је показао да Pten, Ptdach, PTTS1 и цисплатина убијају приближно сличан проценат LLC1 ћелија у свим испитиваним концентрацијама, и у концентрацији 1000 μM као и у концентрацији 7.8 μM . Једино цитотоксички ефекат TS3 показује дозну зависност (Графикон 7). Сличан цитотоксички ефекат Pten, Ptdach, PTTS1 и цисплатине је потврђен и израчунавањем IC50 вредности. За ова четири комплекса није било могуће израчунати IC50 вредност, јер је и након излагања најмањој испитиваној концентрацији комплекса (7.8 μM) проценат вијабилних ћелија био мањи од 50% (табела 1). Слабија цитотоксичност комплекса TS3 је потврђена и израчунавањем IC50 вредности која износи 352.20 \pm 44.20 μM .



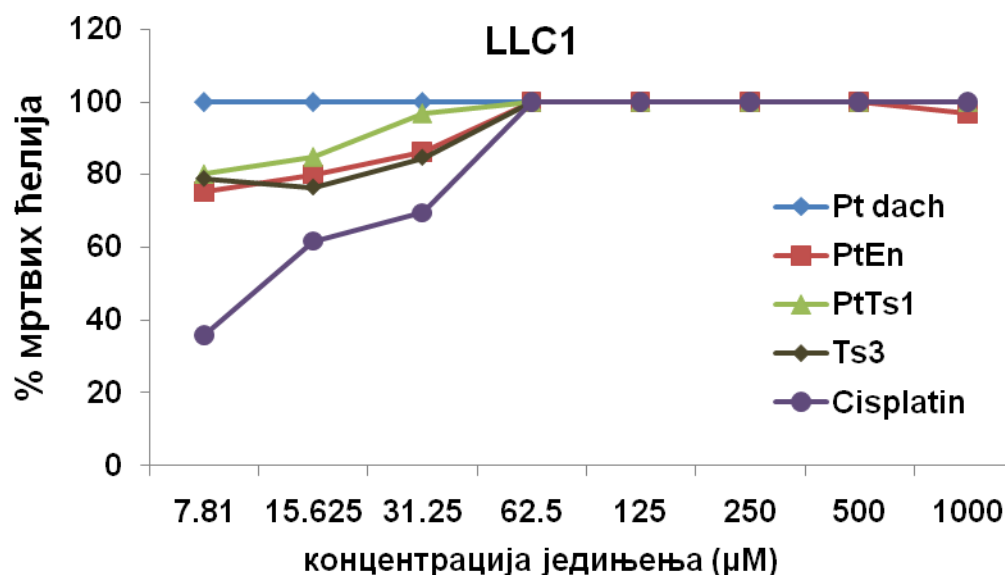
Графикон 7: Цитотоксичност комплекса платине на мишјој линији карцинома плућа LLC1 после 24 сата излагања (мерено МТТ тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) 3 понављања, а сваки од експеримента је рађен у трипликату.

Табела 1: IC50 вредности комплекса платине за ћелијску линију LLC1након 24 сата излагања комплексима

Комплекс	LLC1
Pt dach	< 7.8 µM
Pt en	< 7.8 µM
PTTS1	< 7.8 µM
Ts3	352.20±44.20 µM
Cisplatin	< 7.8 µM

4.2.2. Резултати LDH testa

Резултати LDH testa су врло слични резултатима MTT testa (Графикон 8). Потврђена је изразита цитотоксичност испитиваних комплекса, али је највећа цитотоксичност LDH тестом измерена за Ptdach (убија 100% ћелија у свим концентрацијама), а најслабија за цисплатину која тек од концентрације 62.5 μM убија 100% LLC1 ћелија. Ptdach, PTTS1 и TS3 имају сличну цитотоксичност мерено LDH тестом, у концентрацији 7.8 μM убијају око 80% LLC1 ћелија а од концентрације 62.5 μM убијају 100% LLC1 ћелија.

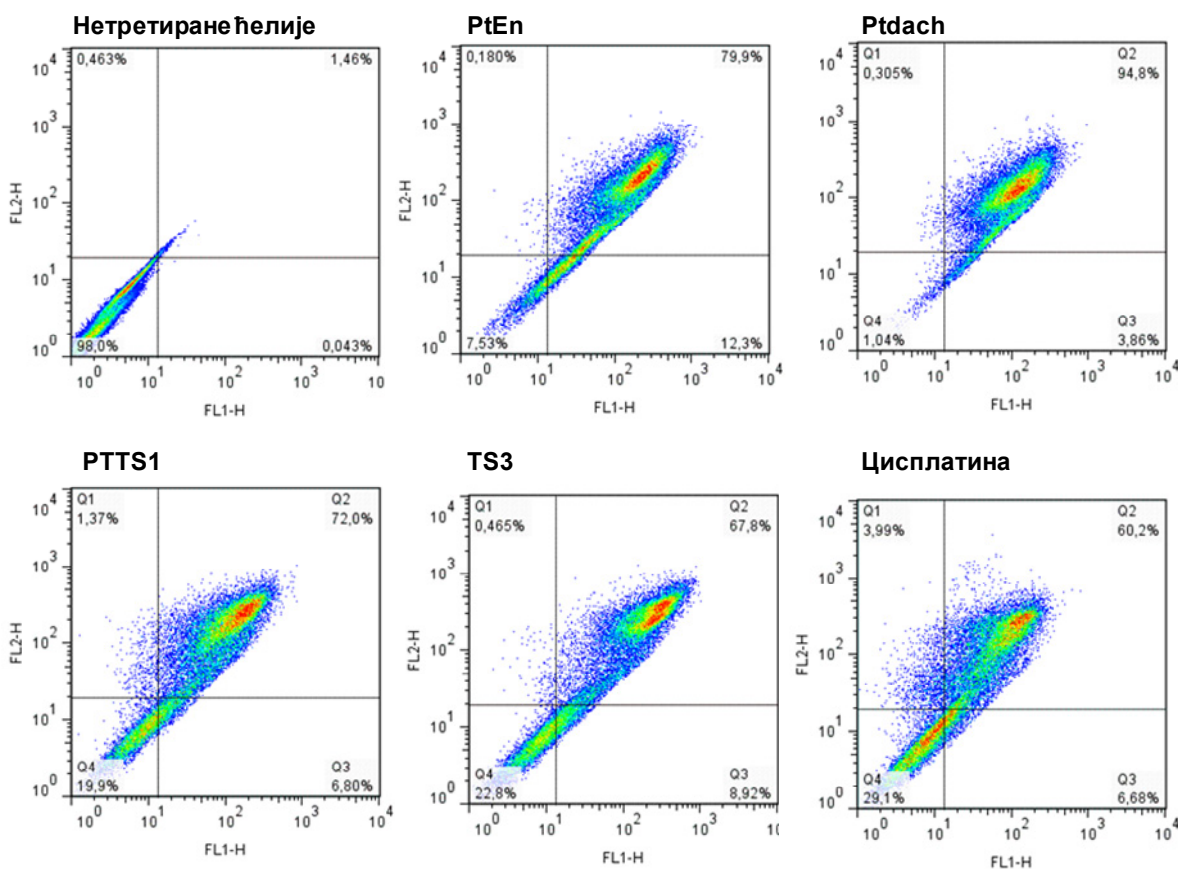


Графикон 8: Цитотоксички ефекат комплекса злата и платине на LLC1 ћелије након 24 сата (мерено LDH тестом). Резултати су приказани као средња вредност (Mean) + стандардна грешка (SE) (3 експеримента са 3 понављања).

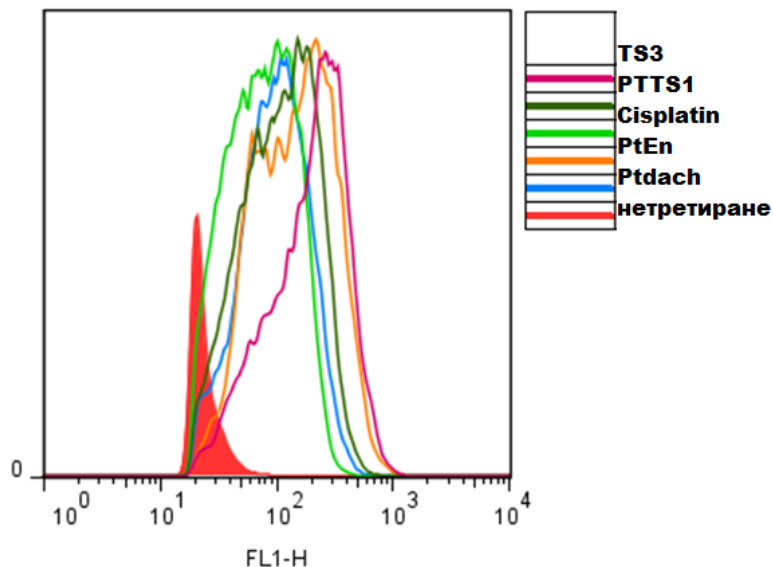
4.2.3. Резултати теста апоптозе

Анализа проточном цитометријом LLC1 ћелија обојених анексином и пропидијум јодидом након 24 сата излагања испитиваним комплексима је потврдила резултате добијене претходним методама да сви испитивани комплекси испољавају врло сличан

цитотоксички ефекат (Графикон 9). Како се види на Графикону 9 проценат касно апоптоичних LLC1 ћелија након култивације са комплексима концентрације 50 μM се креће од 60,20% за цисплатину до 79,9% за PtEn и 94,90% за Ptdach. На графикону 10 који приказује средњу вредност флуоресценце за Annexin V у популацији касно апоптоичних ћелија (Annexin V+ PI+) се такође види да су ефекти испитиваних комплекса и цисплатине на LLC1 ћелије врло слични.



Графикон 9: Репрезентативни dot-plot-ови LLC1 ћелија третираних испитиваним комплексима и цисплатином (концентрације 50 μM) обојених анексином и пропидијум јодидом.

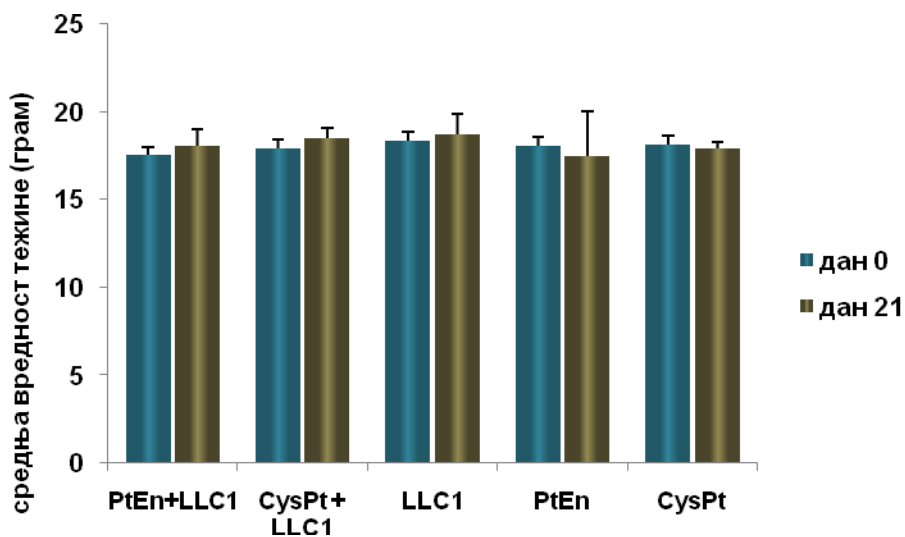


Графикон 10. Хистограм приказује средњу вредност интензитета флуоросценције за Annexin V у популацији касно апоптотичних ћелија третираних испитиваним комплексима концентрације 50 μM .

4.3. Истраживање антитуморске активности комплекса *in vivo*

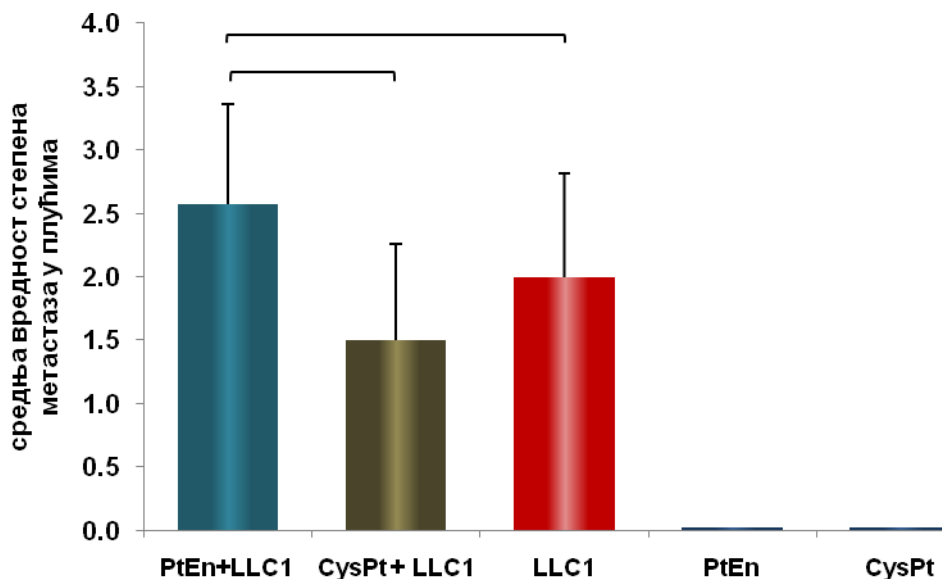
Пошто смо показали да новосинтетисани комплекси платине имају изражен цитотоксични ефекат на ћелије карцинома плућа, како хуманог карцинома, тако и мишијег, наше наредно истраживање се односило на испитивање антитуморске активности комплекса *in vivo*. Одлучили смо да за *in vivo* истраживања користимо PtEn комплекс. Као експериментални модел користили смо метастатски модел карцинома плућа изазван апликацијом LLC1 ћелијске линије у репну вену C57BL/6 миша. Мишеви су од првог дана апликације туморских ћелија примали интраперитонеално и испитивани комплекс PtEn у дози 6 mg/kg телесне масе, а као контролну супстанцу примали су цисплатину у истој дози.

Мишеви су праћени три недеље. Примена комплекса није утицала на преживљавање. Преживели су сви мишеви и из групе која је примала само туморске ћелије. Такође појава метастаза и примена цитостатика није утицала на промену тежине мишева (Графикон 11).



Графикон 11. Средња вредност тежине мишева пре и после примене комплекса.

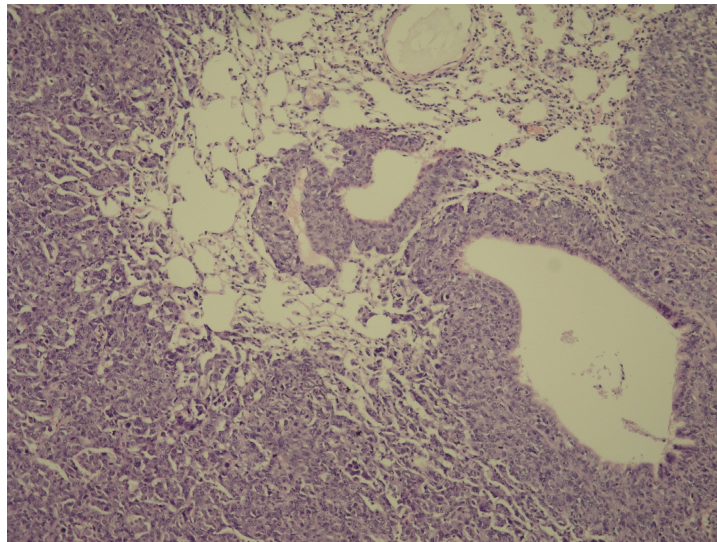
Мишеви су жртвовани три недеље након апликације туморских ћелија, и препарати плућа (10 серијских пресека) обојени хематоксилин еозином су анализирани и израчуната је средња вредност степена метастаза.



Графикон 12. PtEn не утиче на смањено стварање метастатских колонија у плућима. График приказује средњу вредност степена метастазе у плућима три недеље након интравенске апликације LLC1 ћелија и примене испитиваног комплекса и цисплатине (8 мишева у групи, Student t test).

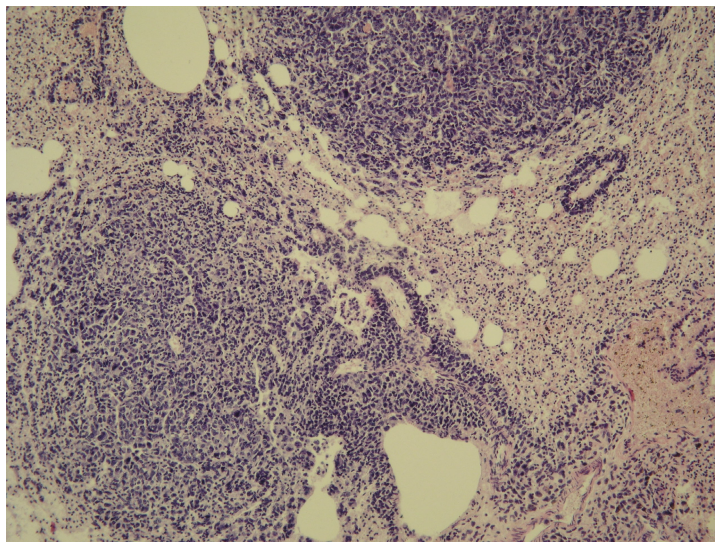
Резултати хистолошке анализе плућа су показали да PtEn комплекс не утиче на смањење појаве метастаза у плућима (Графикон 12). Супротно, средња вредност степена метастаза је статистички значајно већа ($p=0.046$) у групи мишева који су примали PtEn комплекс него у групи мишева који нису третирани цитотоксичним агенсом (примили само туморске ћелије). Уочено је да цисплатина смањује степен метастаза у плућима, али ипак нема статистички значајне разлике у средњој вредности степена метастаза између мишева који су примили само туморске ћелије и мишева који су после примене туморских ћелија третирани цисплатином. Такође, средња вредност степена метастаза у плућима је статистички значајно већа ($p=0.019$) у групи мишева који су третирани PtEn комплексом (PtEn+LLC1) него у групи мишева третираних цисплатином (CysPt+LLC1).

Микорскопско испитивање хистолошког препарата паренхима плућа мишева из групе која је третирана само LLC1 ћелијама је показала изразито бујање малигнућ ћелија које је у неким случајевима скоро у потпуности потиснуло здраво ткиво плућа. (слика 1)



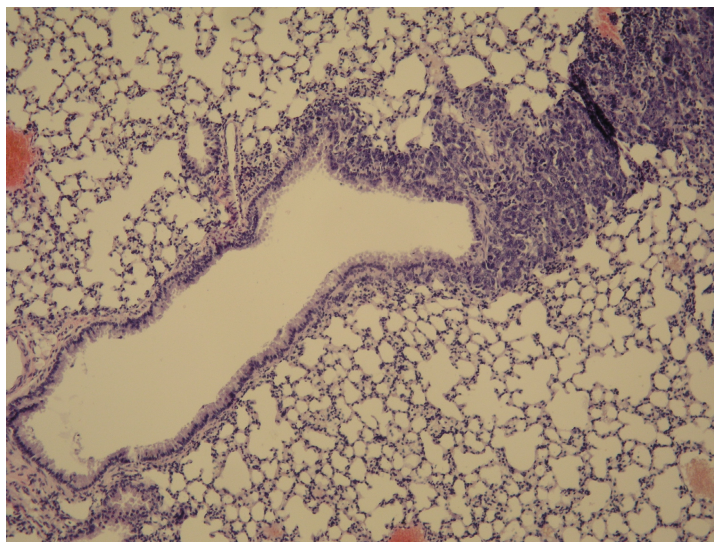
Слика 1. Пресек плућа миша из групе LLC1 (уочљив масиван инфилтрат здравог ткива плућа; 100x увећање)

Хистолошки пресек препарата плућа мишева из групе PtEn+LLC1 јасно показује периваскуларну инфилтрацију здравог ткива плућа са *per continuitatem* ширењем, али у мањој мери него у мишева из нетретиране групе. (слика 2.)



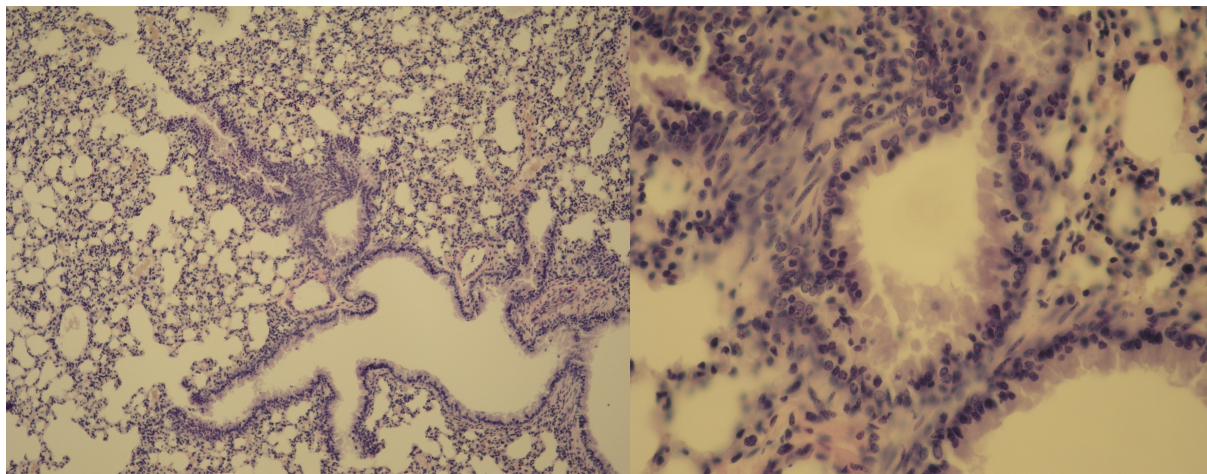
Слика 2. Пресек плућа миша из групе PtEn+LLC1(уочавају се периваскуларни инфилтрати малигним ћелијама;100x увећање)

Слично се може уочити и у мишева из групе CysPt+LLC1, али је степен инфилтрације плућа малигним ћелијама присутан у доста мањој мери. (слика 3.)



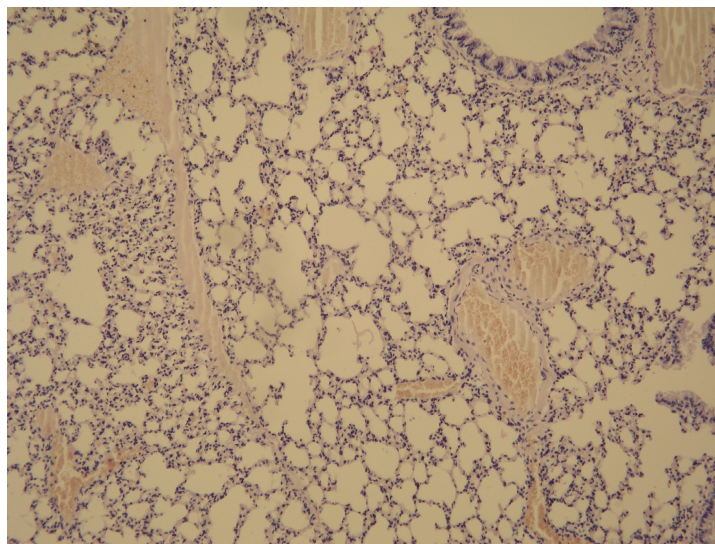
Слика 3. Пресек плућа миша из групе CysPt +LLC1(100x увећање)

Интересантно је поменути да су у групи мишева PtEn+LLC1 као и и код мишева који су примили само PtEn без туморских ћелија запажени изражени перибронхијални запаљенски инфилтрати. (слика 4а и 4б)



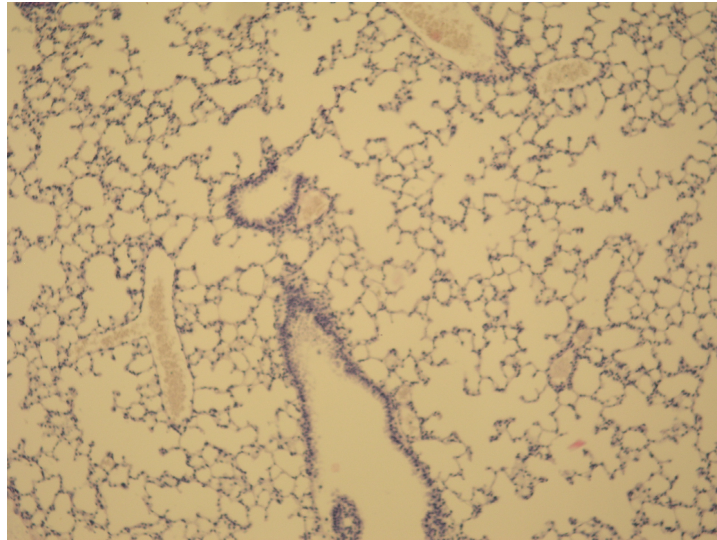
Слика 4 а и 4 б. Пресек плућа миша из групе PtEn (100x и 400x увећање; уочљиви перибронхијални запаљенски инфилтрат лаког степена)

Мишеви третирани само циспалтином нису показали значајне промене у хистолошкој грађи паренхима плућа, као ни појаву перибронхијалног запаљенског инфилтрата.(слика 5)



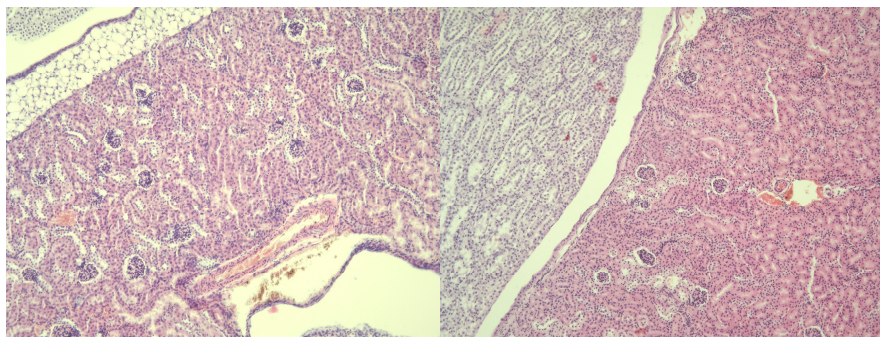
Слика 5. Пресек плућа миша из групе CysPt-здрavo ткиво плућа(100x увећање)

У групи мишева којису били у контролној групи се такође јасно уочава здраво ткиво паренхима плућа без патолошких промена и запљенских инфилтрата.(слика 6)

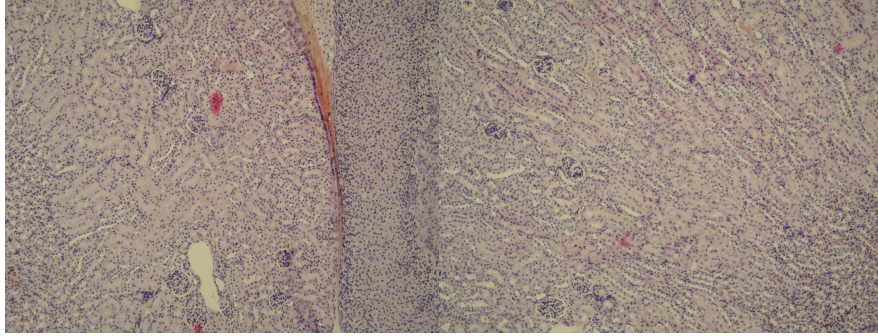


Слика 6. Пресек плућа миша из контролне групе – здраво ткиво плућа(100x увећање)

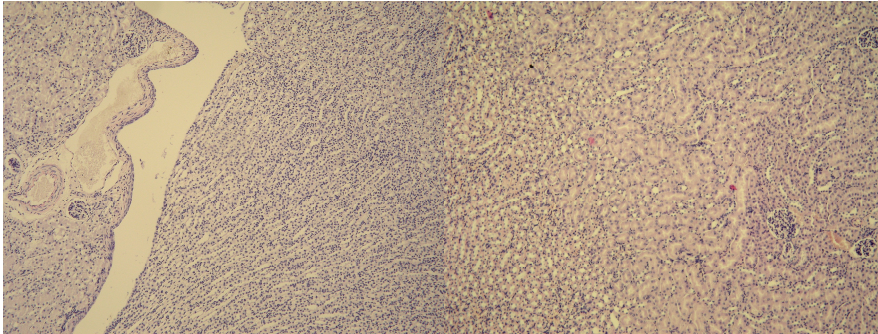
Испитивање хистолошких препарата јетре и бубрега у свим групама није показала значајне разлике у структури ћелија јетре и бубрега. У структурама бубрежних тубула се у свим групама уочава мањи степен хиперемije, уз очуване гломеруларне структуре и интактну базалну мембрану. (слике 7-12)



Слике 7 и 8. Пресек бубрега миша из групе LLC1 и из групе PtEn+LLC1 (100x увећање)

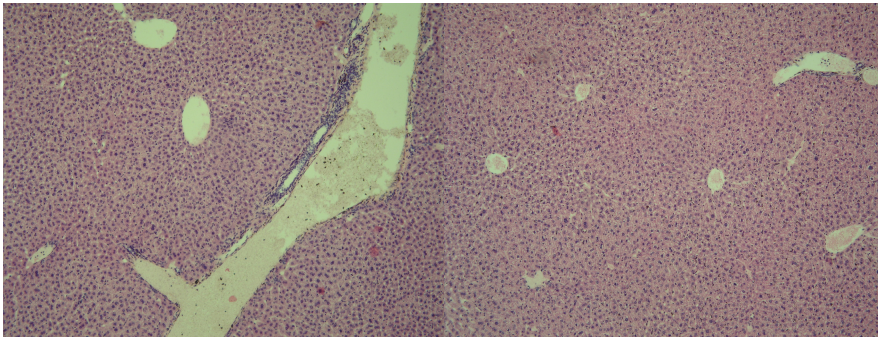


Слике 9 и 10. Пресек бубрега миша из групе CysPt +LLC1и из групе PtEn (100x увећање)

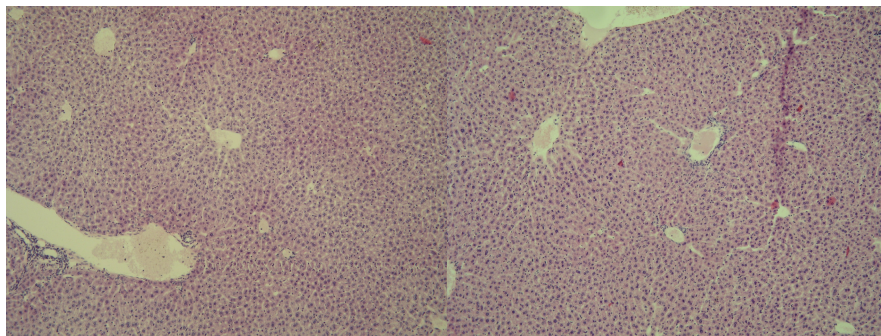


Слика 11. Пресек бубрега миша из групе CysPtи из контролне групе (100x увећање)

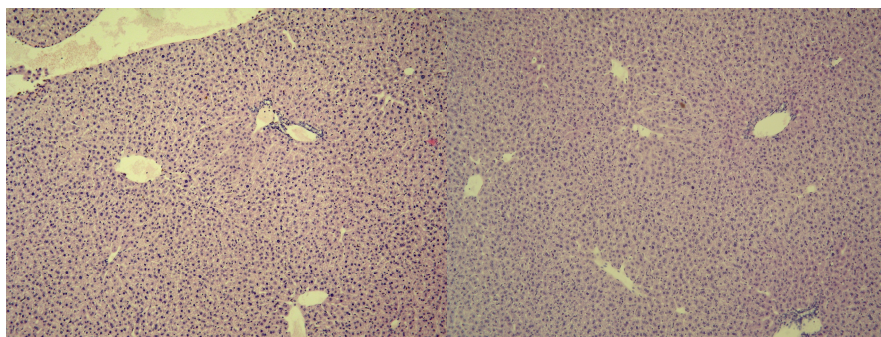
У свим испитиваним групама основне структуре јетре - јетрини ацинуси су у потпуности очуване грађе са ретким појединачним зонама уницелуларне некрозе, без хиперемije или хеморагичних зона, са очуваном базалном мембарном (слике 13-18).



Слика 13 и 14. Пресек јетре миша из групе LLC1 и из групе PtEn+LLC1(100x увећање)

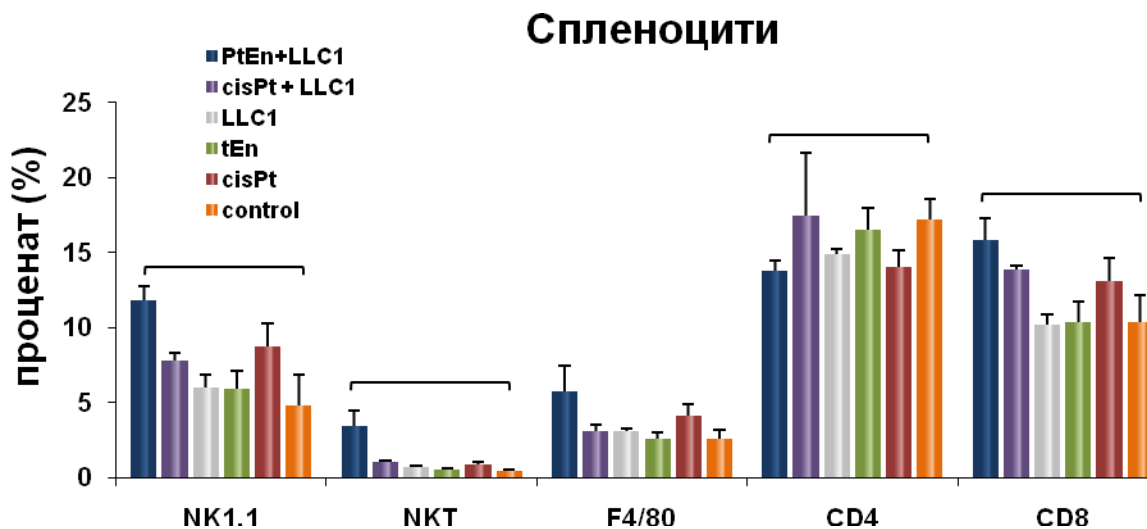


Слика 15 и 16. Пресек јетре миша из групе CysPt +LLC1 и из групе PtEn (100x увећање)



Слика 17 и 18. Пресек јетре миша из групе CysPt и из контролне групе (100x увећање)

Како је *in vitro* истраживањима показан цитотоксични ефекат PtEn на LLC1 ћелије а резултати *in vivo* истраживања указују да овај комплекс не смањује него повећава метастазирање у плућима желели смо да испитамо евентуални имуномодулаторни ефекат овог комплекса. Евентуална имуносупресија изазвана овим комплексом би могла да буде разлог појаве израженијих метастаза у групи мишева која је примала PtEn. Проточном цитометријом је анализирана заступљеност појединих ћелијских популација



Графикон 13. PtEn мења целуларни састав слезине мишева који у примили и туморске ћелије. График приказује средњу вредност процената испитиваних ћелијских популација три недеље након интравенске апликације LLC1 ћелија и примене испитиваног комплекса и цисплатине (8 мишева у групи, Student t test).

Уочено је да се само у групи мишева који су примили поред туморских ћелија и PtEn статистички значајно изменио целуларни састав слезине у односу на групу здравих мишева (Графикон 13). У групи мишева PtEn+LLC1 је статистички значајно већи проценат NK, NKT и CD8+ ћелија у поређењу са групом здравих мишева (control) а статистички је значајно мањи проценат CD4+ ћелија. Ови резултати указују да је могуће да имунорегулаторни утицај PtEn утиче на значајно већу појаву метастаза у плућима у овој групи.

5. ДИСКУСИЈА

Лечење хемиотерапеутицима данас укључује примену великог броја лекова сличног или различитог механизма дејства (алкилирајући агенси, комплекси платине, микротубуларни инхибитори, антимаболити и др.) Антинеопластични лекови имају различите рецепторе. Међутим, сви лекови функционишу тако да изазивају поремећај ћелијског циклуса малигне ћелије са циљем да индукују апоптозу.

У овој докторској дисертацији су компаративно испитивани цитотоксични ефекти различитих комплекса злата и платине на А549 ћелијској линији хуманог карцинома плућа *in vitro*, као и на LLC1 линији мишијег карцинома плућа *in vitro* и *in vivo*. Експериментима смо упоређивали цитотоксичност испитиваних супстанци, што је на крају резултирало одабиром најефикасније и „најпотентније“ супстанце која има најјачи цитотоксични ефекат: PtEn комплекс, чији смо ефекат анализирали и *in vivo*.

5.1. Сви испитивани комплекси злата имају снажну анти-туморску активност индукујући апоптотску смрт ћелија хуманог карцинома плућа

Цитотоксички ефекат комплекса злата на хуманој ћелијској линији карцинома плућа испитиван је коришћењем МТТ и LDH теста. Као контролна ћелијска линија, тј туморски неизмењене ћелије које се брзо деле, коришћене су хумане мезенхималне матичне ћелије (MSC) изоловане из периферне крви. Резултати добијени коришћењем МТТ и LDH теста цитотоксичности, показали су да сви испитивани комплекси злата испољавају цитотоксични ефекат ка ћелијским линијама хуманог и мишијег карцинома плућа, који је дозно и временски зависан.

Тест апоптозе је показао да сви испитивани комплекси злата индукују апоптотску смрт А549 ћелија и да је већина мртвих ћелија била у касној апоптози (AnnexinV+PI+ ћелије). Најтоксичнији ефекат на А549 ћелије, од свих испитиваних једињења, је испољио Au бiру комплекс, који је био знатно цитотоксичнији у поређењу са цисплатином. Проенти мртвих А549 ћелија мерени тестом апоптозе су били знатно мањи у поређењу са процентима мртвих ћелија мереним МТТ тестом што је указало да су МТТ тестом забележене почетне промене у метаболизму митохондрија које су индуковале апоптозу. Са друге стране, проценат мртвих ћелија мерених тестом апоптозе био је значајно мањи услед чињенице да се овим тестом детектују анексин и пропидијум јодид на ћелијској мембрани апоптотичних ћелија, што се дешава знатно касније у односу на промене метаболизма митохондрија детектованих МТТ тестом.

Наши резултати у складу су са претходно публикованим студијама указујући да је апоптоза главни механизам индукције смрти туморских ћелија изложених комплексима тровалентног злата и да се цитотоксични ефекат остварује углавном утицајем на интегритет митохондрија или на функцију протеазома (157). Фераз и сарадници су показали да злато (III) комплекси инхибирају активност тиреодоксин редуктазе узрокујући апоптозу (158). Пантелић и сарадници су користећи ћелијске линије хуманог аденокарцинома цервикса (HeLa) и хумане мијелоидне леукемије (K562) такође указали на апоптозу као један од главних механизма дејства појединих комплекса тровалентног злата (159).

Наш истраживачки тим је претходно испитивао цитотоксичност комплекса злата и на другим ћелијским линијама - ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (160) где је поређено дејство комплекса злата са цисплатином и на ћелијама мишијег карцинома дојке (161). Током овог истраживања, испитивани су цитотоксични ефекти комплекса злата(III) на мишијем моделу карцинома дојке коришћењем 4T1 ћелија, а у компарацији са испитиваним једињењима, коришћена је цисплатина. Сва три тестирана злато(III) комплекса и цисплатина (у свим испитиваним концентрацијама) показали су дозно зависно цитотоксично дејство на 4T1 ћелије, што је потврђено МТТ тестом. Међу испитиваним комплексима најбоље дејство је показао комплекс $[AuCl_2(en)]$. *In vivo* експеримент је потврдио податке добијене *in vitro*, односно $[AuCl_2(en)]$ је испољио

најбоље цитотоксичне ефекте на 4T1 ћелије међу свим испитиваним комплексима злата (III), те код 5 од 6 мишева који су примили ово једињење, није уочен раст тумора. Такође, цисплатина је била ефикасна *in vivo*, чак је била и ефикаснија од [AuCl₂(en)] комплекса јер ни у једном од свих 6 мишева који су примили цисплатину, није уочен раст тумора.

Ефикасност и анти-туморска активност једињења злата потврђена је *in vitro* и на неситноћелијској линији карцинома плућа човека (NCI-H1666) (162) Sanghvi и сарадници су показали снажан *in vitro* анти-туморски ефекат новосинтетисаних комплекса злата који су као лиганд имали 6-6' диметил пиридин: ((sec-butyl)phen)AuCl₃] и [((methyl)bipty)AuCl₃] на ћелијске линије аденокарцинома и сквамозелуларног карцинома неситноћелијског тумора плућа човека Ипак, резултати *in vivo* испитивања су показала да ови комплекси нису успели да значајно смање раст ксенографтног тумора (163). Као и у овој дисертацији, у свим поменутих истраживањима, комплекси злата су показали дозно зависну цитотоксичност. Ипак, до данас су публиковане само једна студија која је детаљније испитивала *in vivo* токсичност комплекса злата (III). Ахмед и сарадници (164.) су показали да је испитивани комплекс [Au(en)Cl₂]Cl показао минимална оштећења у јетри и бубрезима пацова, што је указало да су можда, комплекси злата, релативно безбедни за даље истраживање у смислу дефинисања потенцијално новог хемиотерапеутика.

5.2. Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијске линије хуманог и мишијег карцинома плућа *in vitro*

Резултати нашег истраживања на A549 ћелијама хуманог карцинома плућа су показали да су сви испитивани комплекси злата знатно мање цитотоксични у поређењу са испитиваним комплексима платине, за ћелијску линију хуманог карцинома плућа A549 *in vitro*. Од свих испитиваних комплекса платине, PtEn је показао најснажнији анти-туморски ефекат. Уз то, у већим концентрацијама PtEn је показао знатно већу

цитотоксичност него цисплатина, док је у мањим концентрацијама цитотоксичност PtЕп и цисплатине била уједначена.

Цисплатина, се већ дуже време користи као хемиотерапеутик у лечењу карцинома јајника, тестиса, плућа, бешике и главе и врата (165) Дакле, она је постала једна од најпримењенијих и најефикаснијих антиканцерских лекова који се користе у скоро 50% хемиотерапеутских протокола широм света. Иако почетне стопе терапијског одговора могу бити високе коришћењем овог хемиотерапеутика, клиничка корисност лека је често ограничена појавом стечене или већ постојеће резистенције тумора на сам лек (166, 167) као и бројним нежељеним ефектима, као што су оштећења бубрега, повраћање / мучнина и неуротоксичност (168). Резистентност ћелија тумора на цисплатину остаје главни узрок неуспеха лечења код пацијената са карциномом, а висока токсичност цисплатине ограничава дозу која се може дати пацијенту. Из тог разлога, посвећени су огромни напори у развој нових комплекса на бази платине који могу да превазиђу недостатке цисплатине. Крајњи циљ је пронаћи деривате са високом антитуморском активношћу, које имају подношљивији токсиколошки профил и који неће довести до брзог развоја резистенције. Иако је до сада проучавано више од 1000 комплекса, само 10-20% од њих су били ефикаснио против малигних ћелија, што је описано у неколико претклиничких и клиничких студија (169). Ово укључује сатраплатину која је тренутно у трећој фази клиничког испитивања (170). Такође, постоје и комплекси платине II, који су у неким земљама добили подршку за клиничку примену: Nedaplatin у Јапану, SKI2053R у Јужној Кореји и Lobarlatin у Кини. (171)

Недавно, Жак и сар. су дизајнирали и синтетисали нове комплексе платине (II) и платине (IV) са аминоксидним дериватима адамантана као један од његових лиганата: (SP-4-3) - (1-адамантиламин) аминоксидхлороплатина (II), кодираног као LA-9, и (OC-6-43)-бис (ацетато) (1-адамантил-амин) аминоксидхлороплатина (IV), кодирани као LA-12.(172) Тренутно, клиничка испитивања платине (IV) деривата LA-12 су у току и објављени су прелиминарни, обећавајући резултати. LA-12 је испитиван у широком панелу претклиничких студија, укључујући *in vitro* и *in vivo* испитивање антитуморске ефикасности, као и бројна токсиколошка и фармакокинетичка испитивања (173, 174). У

случају испитивања ADJ/PC6 плазмoцитoма мишијих ћелија и испитивању модела тумора карцинома A2780 људског јајника, *in vivo* антитуморска активност једне дозе као и поновљених доза је уочена, у поређењу са цисплатином и другог платина (IV)-комплекса - сатраплатине (JM216, први орално ординирни платина (IV) лек који је тренутно у клиничким испитивањима) (174).

У ранијим студијама Розенберг и сарадници (175) су показали да платина (IV) комплекси, као и платина (II) комплекси могу да покажу антитуморска својства. Поред тога, платина (IV) комплекси су много инертнији у супституционим лиганд реакцијама него њихови платина (II) комплементи (176), те је опште прихваћено да смањење оксидационог стања платина (II) је од суштинског значаја за антиканцерогену активност платине (IV) комплекса (177, 178).

Истраживања која су вршили чешки аутори Kozubík и сарадници и Turánek и сарадници су показала да LA-9 и LA-12 показују већу хидрофобност од цисплатине и имају већу цитотоксичност него сатраплатина (JM216) *in vitro*. Они су цитотоксичност ових једињења тестирали на панелу од 14 туморских линија различитог порекла и различите осетљивости на цисплатину, укључујући и A2780 (цисплатин-осетљиви) и A2780сус (линија са стеченом резистенцијом на цисплатину) ћелије карцинома јајника, дојке, дебелог црева, плућа (179, 180). Током ових истраживања уочене су значајне разлике између ефеката платине (IV) комплемената LA-12 и платина (II) деривата LA-9 и цисплатине у дејству на SK-OV-3 ћелије, које су биле резистентне на цисплатину (181). Уочено је да су и LA-12 и LA-9 ефикасни у знатно нижим концентрацијама од цисплатине и могу превазићи и стечену и урођену отпорност на цисплатину. Ипак, механизме ефеката ових једињења треба даље истражити, јер су и неке новије студије показале да LA-12 може имати јединствене ефекте који могу бити одговорни за високу ефикасност LA-12 (182, 183).

С обзиром да је показано да су испитивани комплекси платине испољили снажнији цитотоксички ефекат на A549 ћелије у поређењу са ефектима комплекса злата даље смо испитивали цитотоксички ефекат комплекса платине на ћелије мишјег карцинома плућа LLC1, а у циљу одабира најефикасније и „најпотентније“ супстанце која има најјачи цитотоксични ефекат, у циљу одабира комплекса за *in vivo* експеримент.

Резултати МТТ и LDH теста указали су да сви испитани комплекси имају снажан цитотоксички ефекат на LLC1 ћелијску линију. Тестови цитотоксичности и IC50 вредности су показали да Pten, Ptdach, PTTS1 и цисплатина убијају приближно сличан проценат LLC1 ћелија у свим испитиваним концентрацијама, док је најслабију цитотоксичност испољио комплекс TS3. Анализа проточном цитометријом LLC1 ћелија обојених анексином и пропидијум јодидом након 24 сата излагања испитиваним комплексима је потврдила резултате добијене претходним методама да сви испитивани комплекси испољавају врло сличан цитотоксички ефекат. Сви испитивани комплекси платине узроковали су апоптозу LLC1 ћелија.

5.3. PtEn комплекс има слабу анти-туморску активност *in vivo*, али значајно мења целуларни састав слезине мишева који у примили LLC1 туморске ћелије

Пошто смо показали да новосинтетисани комплекси платине имају изражен цитотоксични ефекат на ћелије карцинома плућа, како хуманог карцинома, тако и мишјег, одабрали смо најцитотоксичнији комплекс. Међу свим испитиваним комплексима платине, најснажнији анти-туморски ефекат ка LLC1 ћелијама је показао Pten. Због тога смо се и одлучили да ефикасност овог комплекса испитамо и *in vivo*. Као експериментални модел користили смо метастатски модел карцинома плућа изазван апликацијом LLC1 ћелијске линије у репну вену C57BL/6 миша. Мишеви су праћени три недеље. Примена комплекса није утицала на преживљавање. Преживели су сви мишеви и из групе која је примала само туморске ћелије. Такође појава метастаза и примена цитостатика није утицала на промену тежине мишева. Резултати хистолошке анализе плућа су показали да PtEn комплекс не утиче на смањење појаве метастаза у плућима.

Наши резултати су аналогни резултатима публикованим у бројним студијама сличног дизајна која су показала постојање дискрепанце између анти-туморских ефеката једињења платине забележених *in vitro* и *in vivo*. Морето и сарадници су показали снажан

цитотоксични ефекат 8 од 24 тестирана јкомплекса платине (II) ка ћелијама хуманог карцинома колона и јажника, који је био статистички значајно већи у поређењу са цисплатином, оксиплатином или карбоплатином. Ипак, ниједан од 8 комплекса није био ефикасан *in vivo*, а поједини комплекси су показали и знатну нефротоксичност. (184). Ма и сарадници су показали да замена тиоуреје са амидном групом у структури комплекса платине (II) значајно мења механизам дејства и повећава *in vitro* и *in vivo* цитотоксичност ових комплекса ка H460 ћелијској линији не-ситно ћелијског карцинома плућа. (185). Комеда и сарадници су међу бројним испитиваним динуклеарним комплексима платине (II), изузетно ефикасним *in vitro*, показали да је *in vivo* ефикасан за лечење карцинома желуца само комплекс $[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{]}_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-5-CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5\text{-tetrazolato-N}_{2,3})_2$, тиме додатно потврђујући несклад између цитотоксичних ефеката комплекса платине (II) *in vitro* и *in vivo*. (186).

Како је *in vitro* истраживањима показан цитотоксични ефекат PtEn на LLC1 ћелије а резултати *in vivo* истраживања укузују да овај комплекс не смањује него чак и повећава метастазирање у плућима желели смо да испитамо евентуални имуномодулаторни ефекат овог комплекса. Слаб анти-туморски ефекат комплекса платине (II) може се објаснити њиховим цитотоксичним ефектом на мононуклеарне ћелије, односно нежељеним ефектима насталим услед супресије имунског одговора. Уочили смо и у групи мишева којима су апликоване туморске ћелије и PtEn комплекса, али и код мишева који су примили само PtEn без туморских ћелија, изражене перибронхијални запаљенски инфилтрати.

Евентуална имуносупресија изазвана PtEn комплексом би могла да буде разлог настајања запаљенских инфилтрата у плућима. Проточном цитометријом је анализирана заступљеност појединих ћелијских популација.

Уочено је да се само у групи мишева који су примили поред туморских ћелија и PtEn статистички значајно изменио целуларни састав слезине у односу на групу здравих мишева. Значајно је био мањи проценат CD4⁺ Т ћелија посебно важних за активацију макрофага и В лимфоцита, ондосно важну за хуморални имунски одговор усмерен против екстрацелуларних антигена. Наши резултати су у складу са резултатима које је

публиковала група руских аутора. Брин и сарадници су показали да *in vivo* примена комплекса платине (IV) узрокује дозно-зависну супресију CD4+ Т лимфоцита и значајно инхибира хуморални имунски одговор. (187)

6. ЗАКЉУЧЦИ

Из свега претходно описаног, можемо закључити следеће:

- Сви испитивани комплекси злата имају снажну анти-туморску активност индукујући апоптотску смрт ћелија хуманог карцинома плућа
- Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијске линије хуманог и мишјег карцинома плућа *in vitro*
- PtEn комплекс има слабу анти-туморску активност *in vivo*, али значајно мења целуларни састав слезине мишева који су примили LLC1 туморске ћелије

7. Литература

1. Mackenzie IC. Stem cell properties and epithelial malignancies. *Eur J Cancer* 2006;42:1204
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M, Roberts K., Watson J.D. U: *Molecular Biology of the cell*, Garland Publishing, Inc. New York & London, 1994, 721-786.
3. Ikić D., Pavelić K., Spaventi R. *Onkogeni i faktori rasta*. Zagreb: Gloous/JAZU; 1989.
4. Павловић Д, Коцић Г, Ђорђевић В ћелијска сигнализација у контроли целијског циклуса, апоптозе и Малигне трансформације. *Acta Fac. Med. Naiss.* 2002; 19 (1) , 12-18.
5. Forrest D., Curran T. Crossed signals: oncogenic transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2:19-27.
6. Hollstein M. p 53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-52.
7. Moll, U. M., Zaika, A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS letters*,2001. 493(2), 65-69.
8. Hickman, E. S., Moroni, M. C., Helin, K.. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Current opinion in genetics & development*, 2002, 12(1), 60-66.
9. Kasten, M. M., Giordano, A. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell death and differentiation*, 1998, 5(2), 132.
10. Abshire, M. K., Buzard, G. S., Shiraishi, N., Waalkes, M. P. Induction of c-myc and c-jun proto-oncogene expression in rat L6 myoblasts by cadmium is inhibited by zinc preinduction of the metallothionein gene. *Journal of toxicology and environmental health*, 1996, 48(4), 359-377.
11. Herrlich, P., Angel, P., Jobst Rahmsdorf, H., Mallick, U., Pöting, A., Hieber, L., ... Schorpp, M. The mammalian genetic stress response. *Advances in enzyme regulation*, 25, 1986, 485-488.
12. Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., Leder, P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35(3), 1983, 603-610.

13. Dean, M., Levine, R. A., Ran, W., Kindy, M. S., Sonenshein, G. E., Campisi, J. Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *Journal of Biological Chemistry* 261.20 1986: 9161-9166.
14. Weinberg, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research* 49.14 ,1989: 3713-3721.
15. J Leavitt, G Latter, L Lutomski, D Goldstein, S Burbeck Tropomyosin isoform switching in tumorigenic human fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 6.7, 1986: 2721-2726.
16. Keski-Oja J, Sen A, Todaro GJ. Direct association of fibronectin and actin molecules in vitro. *The Journal of cell biology* 85.3 1980: 527-533.
17. Weinstein, I. B. Growth factors, oncogenes, and multistage carcinogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 33.3 1987: 213-224.
18. Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clinical cancer research* 15.4 2009: 1133-1139.
19. Rosfjord EC, Dickson RB. Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 4.2 1999: 229-237.
20. Vaahtokari A, Aberg T, Thesleff I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 122.1 1996: 121-129.
21. Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, Mossetti C, Ardisson F, Lausi P, Scagliotti GV. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology* 15.1 2004: 28-32.
22. Zacharatos P, Kotsinas A, Tsantoulis P, Evangelou K, Kletsas D, Asimacopoulos PJ, Doussis-Anagnostopoulou I, Pezzella F, Gatter K, Papavassiliou AG, Kittas C, Gorgoulis VG. Relationship of the K-ras/c-mos expression patterns with angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Molecular Medicine* 7.9 2001: 590.
23. D Hanahan, RA Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell* 100.1 2000: 57-70.
24. GS Salvesen, VM Dixit. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91.4 1997: 443-446.

25. Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, Batzer A, Thomas S, Brugge J, Pelicci PG, Schlessinger J, Pawson T, et al. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360.6405 1992: 689-692.
26. Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Permuter RM, Taniguchi T. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 81.2 1995: 223-231.
27. Parsons JT, Parsons SJ. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Current opinion in cell biology* 9.2 1997: 187-192.
28. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252.5006 1991: 668-674.
29. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387.6636 1997: 921-924.
30. Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H. Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene* 10.8 1995: 1465-1473.
31. O'Neill EM, Rebay I, Tjian R, Rubin GM. The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78.1 1994: 137-147.
32. Khosravi-Far, R., Der, C. J. The Ras signal transduction pathway. *Cancer and Metastasis Reviews* 13.1 1994: 67-89.
33. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. 1993: 45-51.
34. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology* 9.7 (2008): 517-531.

35. Wiesmüller L, Wittinghofer F. Signal transduction pathways involving Ras. *Cellular signalling* 6.3 1994: 247-267.
36. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in biochemical sciences* 19.7 1994: 279-283.
37. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms. *Science* 286.5443 1999: 1358-1362.
38. Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the Cell* 93.1-2 2001: 53-62.
39. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell* 6.4 2004: 313-319.
40. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268.5208 1995: 233-239.
41. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88.4 1997: 435-437.
42. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 37.2 2004: 449-471.
43. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129.7 2007: 1261-1274.
44. Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279.5350 1998: 558-560.
45. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2.7 2002: 489-501.
46. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366.6456 1993: 643-654.

47. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information* 264.5164 1994: 1415-1420.
48. Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annual review of biochemistry* 64.1 1995: 621-652.
49. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine* 350.21 2004: 2129-2139.
50. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer* 9.11 2009: 798-809.
51. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin. *Science* 296.5573 2002: 1644-1646.
52. Fodde R, Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current opinion in cell biology* 19.2 2007: 150-158.
53. Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Developmental cell* 8.5 2005: 727-738.
54. Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 441.7092 2006: 431-436.
55. Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: the enemy within. *Cancer cell* 6.3 2004: 203-208.
56. Axelson H. Notch signaling and cancer: emerging complexity. *Seminars in cancer biology*. Vol. 14. No. 5. Academic Press, 2004.
57. Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, Donzelli M, Tosoni D, Volorio S, Pelosi G, Spaggiari L, Mazzarol G, Viale G, Pece S, Di Fiore PP. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.52 2009: 22293-22298.
58. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 5.12 2006: 1026-1033.

59. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422.6929 2003: 313-317.
60. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113.6 2003: 685-700.
61. Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of the TGF- β pathway in human cancers. *Cytokine & growth factor reviews* 7.1 1996: 93-102.
62. Johnson GL, Vaillancourt RR. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 230-238.
63. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 285.5430 1999: 1028-1033.
64. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry* 56.1 1987: 615-649.
65. Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C., Morrison, P. T., Salgia, R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine & growth factor reviews* 13.1 2002: 41-59.
66. Johnson, G. L., Vaillancourt, R. R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 230-238.
67. Fidler I. J., Hart I. R. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217.4564 1982: 998-1003.
68. Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 989.1 1989: 65-84.
69. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer* 4.6 2004: 448-456.
70. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3.7 1997: 730-737.
71. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849.
72. Kerr JFK, Wyllie AH, Currie AH. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239.

73. Han nun VA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997;89:1845–1853.
74. Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, et al. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Sem Immunol* 1992;4:389
75. Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of cancerogenesis. *Biochemistry* 2000; 65: 2-27
76. Forrest D., Curran T. Crossed signals: oncogenic transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2:19-27.
77. Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS letters* 493.2 2001: 65-69.
78. Pandey S, Wang E. Cells on route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdcz and RB phosphorylation resembling events of early cell traverse. *J Cell Biochem* 1995;58:135
79. Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, et al. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Sem Immunol* 1992;4:389.
80. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann, SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* 68.1 1999: 383-424.
81. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008, *European Journal of Cancer* 2010;46;4:765–781.
82. Kodama M, Kaneko M, Aida M, et al. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. *Anticancer Res* 1997;17:433.
83. Pope CA, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132.
84. Cassidy A, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer* 2008;98:270.;
85. Matakidou A, et al. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005;93:825.
86. Beckett WS. Epidemiology and etiology of lung cancer. *Clin Chest Med* 1993;14:1.;

87. Cassidy A, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer* 2008;98:270.
88. Otto WR, Wright NA. Stem cells of the lung. In Corrin B, ed. *Pathology of Lung Tumors*. New York: Churchill Livingstone, 1997.
89. Brambilla E, et al. The new World Health Organization classification of lung tumors. *Eur Respir J* 2001;18:1059.
90. Brambilla E. Basaloid carcinoma of the lung. In Corrin B, ed. *Pathology of Lung Tumors*. New York: Churchill Livingstone, 1997:71.
91. Yesner R, Carter D. Pathology of carcinoma of the lung: changing patterns. *Clin Chest Med* 1982;3:257.;
92. Yesner R. Heterogeneity of small cell carcinoma of the lung. In Mountain CF, Carr DT, eds. *Lung Cancer: Current Status and Prospects for the Future*. Austin: University of Texas Press, 1986:3.
93. Roggli VL, et al. Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol* 1985;16:569.
94. Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest* 1993;103:449.
95. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA-A Cancer J Clin* 1999;49(1):33.
96. Colby TV, Koss MN, Travis WD. Tumors of the lower respiratory tract; Armed Forces Institute of Pathology fascicle, third series. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1995.
97. Tomaszefski JF, Jr, Connors AF, Jr, Rosenthal ES, et al. Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival. *Arch PatholLab Med* 1990;114:468
98. Chaudhuri MR. Primary pulmonary cavitating carcinomas. *Thorax* 1973;28:354.
99. Carlile A, Edwards C. Poorly differentiated squamous carcinoma of the bronchus: a light and electron microscopic study. *J Clin Pathol* 1986;39:284.
100. Carter D. Squamous cell carcinoma of the lung: an update. *Semin Diagn Pathol* 1985;2:226.

101. Melamed MR, Zaman MB, Flehinger BJ, et al. Radiologically occult in situ and incipient invasive epidermoid lung cancer: detection by sputum cytology in a survey of asymptomatic cigarette smokers. *Am J Surg Pathol* 1977;1:5
102. Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al. in collaboration with pathologists from 14 countries. *Histological typing of lung and pleural tumors*, 3rd ed. Berlin: Springer Verlag, 1999.
103. Churg A, Johnston WH, Stulbarg M. Small cell squamous and mixed small cell squamous—small cell anaplastic carcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol* 1980;4:255.
104. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. Lung cancer [published erratum appears in *Cancer* 1995;75(12):2979]. *Cancer* 1995;75:191.
105. World Health Organization. *Histological typing of lung tumors*, 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1981.
106. Kodama T, Shimosato Y, Watanabe S, et al. Six cases of well-differentiated adenocarcinoma simulating fetal lung tubules in pseudoglandular stage. Comparison with pulmonary blastoma. *Am J Surg Pathol* 1984;8:735.
107. Moran CA, Hochholzer L, Fishback N, et al. Mucinous (So-called colloid) carcinomas of lung. *Mod Pathol* 1992;5:634.
108. Dixon AY, Moran JF, Wesselius LJ, et al. Pulmonary mucinous cystic tumor. Case report with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1993;17:722.
109. Kragel PJ, Devaney KO, Travis WD. Mucinous cystadenoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:740.
110. Kish JK, Ro JY, Ayala AG, et al. Primary mucinous adenocarcinoma of the lung with signet-ring cells: a histochemical comparison with signet-ring cell carcinomas of other sites. *Hum Pathol* 1989;20:1097.
111. Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al. in collaboration with pathologists from 14 countries. *Histological typing of lung and pleural tumors*, 3rd ed. Berlin: Springer Verlag, 1999.
112. Chan JK, Hui PK, Tsang WY, et al. Primary lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. A clinicopathologic study of 11 cases. *Cancer* 1995;76(3):413;

113. Moro D, Brichon PY, Brambilla E, et al. Basaloid bronchial carcinoma. A histologic group with a poor prognosis. *Cancer* 1994;73(11):2734
114. Kreisman H, Wolkove N, Quoix E. Small cell lung cancer presenting as a solitary pulmonary nodule. *Chest* 1992;101:225.
115. Gephardt GN, Grady KJ, Ahmad M, et al. Peripheral small cell undifferentiated carcinoma of the lung. Clinicopathologic features of 17 cases. *Cancer* 1988;61:1002.
116. Hirsch FR, Matthews MJ, Aisner S, et al. Histopathologic classification of small cell lung cancer. Changing concepts and terminology. *Cancer* 1988;62:973.
117. Fraire AE, Johnson EH, Yesner R, et al. Prognostic significance of histopathologic subtype and stage in small cell lung cancer. *Hum Pathol* 1992;23:520.
118. Sehested M, Hirsch FR, Osterlind K, et al. Morphologic variations of small cell lung cancer. A histopathologic study of pretreatment and posttreatment specimens in 104 patients. *Cancer* 1986;57:804.
119. Mangum MD, Greco FA, Hainsworth JD, et al. Combined small-cell and non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:607.
120. Tsubota YT, Kawaguchi T, Hosono T, et al. A combined small cell and spindle cell carcinoma of the lung. Report of a unique case with immunohistochemical and ultrastructural studies. *Am J Surg Pathol* 1992;16:1108.
121. Fishback NF, Travis WD, Moran CA, et al. Pleomorphic (spindle/giant cell) carcinoma of the lung. A clinicopathologic correlation of 78 cases. *Cancer* 1994;73:2936.
122. Sümmerrmann E, Huwer H, Seitz G. Carcinosarcoma of the lung, a tumour which has a poor prognosis and is extremely rarely diagnosed preoperatively. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;38:247
123. UICC International Union Against cancer. TNM classification of malignant tumours, 6th ed; New York: Willey-Liss, 2002
124. Watanabe Y. TNM classification for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 9: 343-350, 2003
125. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111: 1710-1717, 1997.

126. Richards MA, Ramirez LF, Degner LF, et al. Offering choice of treatment to patients with cancers. *Eur J Cancer* 1995;31A:112., Samet J, Hunt WB, Key C, et al. Choice of cancer therapy varies with age of the patient. *JAMA* 1986;255:3385.
127. Einhorn LH. Approaches to drug therapy in older cancer patients. *Oncology* 1996;6[Suppl]:69.,
128. Leslie WT. Chemotherapy in older cancer patients. *Oncology* 1992;6[Suppl]:74.
129. Stewart CF, Pieper JA, Arburk SG, et al. Altered protein binding of etoposide in patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:49.
130. Baker SD, Growchow LB, Donehower RB. Should anticancer drug doses be adjusted in the obese patient? *J Natl Cancer Inst* 1995;87:333.

131. Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, Katagami N, Ariyoshi Y. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 17.9 1999: 2692-2692.
132. Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, Kozlowski M, Le Péchoux C, Pirker R, Pinel MI, Tarayre M, Le Chevalier T. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *Journal of clinical oncology* 28.1 2010: 35-42.
133. Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ, Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.5 2011: 1850-1855.
134. Raj GV, Karavadia S, Schlomer B, Arriaga Y, Lotan Y, Sagalowsky A, Frenkel E. Contemporary use of perioperative cisplatin-based chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Cancer* 117.2 2011: 276-282.
135. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* 22.8 2011: 1736-1747.

136. Máthé C, Bohács A, Duffek L, Lukácsovits J, Komlosi ZI, Szondy K, Horváth I, Müller V, Losonczy G. Cisplatin nephrotoxicity aggravated by cardiovascular disease and diabetes in lung cancer patients. *European Respiratory Journal* 37.4 2011: 888-894.
137. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7.8 2007: 573-584.
138. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crinò L, Gridelli C, Ricci S, Matano E, Boni C, Marangolo M, Failla G, Altavilla G, Adamo V, Ceribelli A, Clerici M, Di Costanzo F, Frontini L, Tonato M; Italian Lung Cancer Project. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology* 20.21 2002: 4285-4291.
139. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chemical reviews* 99.9 1999: 2451-2466.
140. Wheate NJ, Collins JG. Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coordination chemistry reviews* 241.1 2003: 133-145.
141. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes—state of the art and future perspectives. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 2003. 1-53.
142. Kostova I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1.1 2006: 1-22.
143. Wang X. Fresh platinum complexes with promising antitumor activity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 10.5 2010: 396-411.
144. Pratesi G, Perego P, Polizzi D, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Manzotti C, Giuliani FC, Pezzoni G, Tognella S, Spinelli S, Farrell N, Zunino F. A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts. *British journal of cancer* 80.12 1999: 1912.
145. Manzotti C, Pratesi G, Menta E, Di Domenico R, Cavalletti E, Fiebig HH, Kelland LR, Farrell N, Polizzi D, Supino R, Pezzoni G, Zunino F. BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clinical cancer research* 6.7 2000: 2626-2634.

146. Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.7 2003: 3611-3616.
147. Amani V, Safari N, Khavasi HR, Akkurt M. Synthesis, characterization and crystal structure determination of platinum (IV) complexes containing, bipyridine derivatives and chloride; *Polyhedron* 28.14 2009: 3026-3030.
148. Wong KMC, Tang WS, Chu BWK, Zhu N, Yam VWW. Synthesis, photophysical properties, and biomolecular labeling studies of luminescent platinum (II)-terpyridyl alkynyl complexes. *Organometallics* 23.14 2004: 3459-3465.
149. Baddley WH, Basolo F, Gray HB, Nolting C, Poe AJ. Acidodiethylenetriaminegold(III) Complexes: Preparation, Solution Chemistry, and Electronic Structure, *Inorg. Chem.*, 1963, 2 (5), pp 921–928.
150. L. H. Skibsted, Jannik Bjerrum, P. S. Frederichsen, K. F. Nakken, Studies on Gold Complexes. I. Robustness, Stability and Acid Dissociation of the Tetramminegold(III) Ion, *ACTA CHEM SCAND.* 01/1974.
151. Baicu SC, Taylor MJ. "Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency". *Cryobiology* 45 (1) 2002: 33–48.
152. Kim D, Scranton A. The role of diphenyl iodonium salt (DPI) in three-component photoinitiator systems containing methylene blue (MB) and an electron donor. *J Polymer Sci (Part A Polymer Chem)* 2004;42:5863–5871.
153. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *Journal of immunological methods* 184.1 1995): 39-51.
154. Tsai MS, Chang CC, Kuo ML, Wu YT. Vascular endothelial growth factor-A and changes in a tumor-bearing mouse model with Lewis lung cancer. *Oncol Lett.* 2011; 2:1143-1147.

155. Tsai, M. S., Kuo, M. L., Chang, C. C., & Wu, Y. T. The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. *Cancer Biomarkers*, 13:5 2013, 307-313.
156. Lillie RD, Fullmer HM *Histopathologic technic and practical histochemistry*. New York: McGraw-Hill.1976.
157. Nardon C, Boscutti G, Fregona D. Beyond platinum: gold complexes as anticancer agents. *Anticancer Res.* 2014 Jan;34(1):487-92
158. Ferraz KS, Da Silva JG, Costa FM, Mendes BM, Rodrigues BL, dos Santos RG, Beraldo H. N(4)-tolyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazones and their platinum(II,IV) and gold(III) complexes: cytotoxicity against human glioma cells and studies on the mode of action. *Biometals.* 2013 Oct;26(5):677-91
159. Pantelić N, Zmejkovski BB, Trifunović-Macedoljan J, Savić A, Stanković D, Damjanović A, Juranić Z, Kaluđerović GN, Sabo TJ. Gold(III) complexes with esters of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem.* 2013;128:146-53
160. M. Milovanovic, A. Djekovic, V. Volarevic, B. Petrovic, N. Arsenijevic, Z.D.Bugarcic, J. *Inorg. Biochem.* 10.4 2010; 944–949
161. V. Volarevic, M. Milovanovic, A. Djekovic, B. Petrovic, N. Arsenijevic, Z.D.Bugarcic, J. *Buon.* 15 .4 2010; 768–773.
162. H. Sivaram, J. Tan, H.V. Huynh, *Organometallics* 31 2012; 5875–5883.
163. Sanghvi CD, Olsen PM, Elix C, Peng SB, Wang D, Chen ZG, Shin DM, Hardcastle KI, MacBeth CE, Eichler JF. Antitumor properties of five-coordinate gold(III) complexes bearing substituted polypyridyl ligands. *J Inorg Biochem.* 2013;128:68-76
164. Ahmed A, Al Tamimi DM, Isab AA, Alkhawajah AMM, Shawarby MA. Histological Changes in Kidney and Liver of Rats Due to Gold (III) Compound [Au (en) Cl₂] Cl. *PLoS one*, 7:12 2012, e51889.
165. Loehrer PJ, Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin, *Annals of Internal Medicine*, 100: 5, 1984. 704–713,

166. Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, *Drug Resistance Updates*, 8:3, 2005, 131–146
167. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4:4, 2005:307–320,
168. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 4:6, 2003: 889–901,
169. Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). *Oncology reports* 11:3 2004: 559-595.
170. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *Journal of Clinical Oncology*, 17:1 1999, 409-409.

171. O'Dwyer P J, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs, *Drugs* 59.4 2000: 19-27.
172. Zák F, Turánek J, Kroutil A, Sova P, Mistr A, Poulová A, Mikolin P, Zák Z, Kasná A, Záluská D, Neca J, Sindlerová L, Kozubík A. Platinum (IV) complex with adamantylamine as nonleaving amine group: synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity against a panel of cisplatin-resistant cancer cell lines. *Journal of medicinal chemistry* 47.3 2004: 761-763.
173. Cermanova J, Chladek J, Soval P, Kroutil A, Semerad M, Berankova Z, Siroky P, Surova I. Single-dose pharmacokinetics of a novel oral platinum cytostatic drug ((OC-6-43)-bis (acetato)(1-adamantylamine) amminedichloroplatinum (IV)) in pigs. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 26.9 2004: 679-686.
174. Sova P, Mistr A, Kroutil A, Zak F, Pouckova P, Zadinova M. Preclinical anti-tumor activity of a new oral platinum (IV) drug LA-12. *Anti-cancer drugs* 16.6 2005: 653-657.
175. Rosneberg B, Vancanp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205.4972 1965: 698-699.
176. Giandomenico CM, Abrams MJ, Murrer BA, Vollano JF, Rheinheimer MI, Wyer SB, Bossard GE, Higgins JD. Carboxylation of kinetically inert platinum(IV) hydroxy

- complexes. An entrée orally-active platinum(IV) antitumoragents, *Inorg Chem.* 1995 34.5:1015-21.
177. Talman EG, Kidani Y, Mohrmann L, Reedijk J. Can Pt (IV)—amine complexes act as ‘prodrugs’? *Inorganica chimica acta* 283.1 1998: 251-255.
178. Wang Y, Chiu JF. Proteomic approaches in understanding action mechanisms of metal-based anticancer drugs. *Met Based Drugs.* 2008;2008:716329.
179. Kozubík A, Horváth V, Svihálková-Sindlerová L, Soucek K, Hofmanová J, Sova P, Kroutil A, Zák F, Mistr A, Turánek J. High effectiveness of platinum (IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro. *Biochemical pharmacology* 69.3 2005: 373-383.
180. Turánek J, Kasná A, Záluská D, Neca J, Kvardová V, Knötigová P, Horváth V, Sindlerová L, Kozubík A, Sova P, Kroutil A, Zák F, Mistr A. New platinum (IV) complex with adamantylamine ligand as a promising anti-cancer drug: comparison of in vitro cytotoxic potential towards A2780/cisR cisplatin-resistant cell line within homologous series of platinum (IV) complexes. *Anti-Cancer Drugs* 15.5 2004: 537-543.
181. Horváth V, Blanárová O, Svihálková-Sindlerová L, Soucek K, Hofmanová J, Sova P, Kroutil A, Fedorocko P, Kozubík A. Platinum (IV) complex with adamantylamine overcomes intrinsic resistance to cisplatin in ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* 102.1 2006: 32-40.
182. Procházka L, Turánek J, Tesarík R, Knotigová P, Polásková P, Andrysík Z, Kozubík A, Zák F, Sova P, Neuzil J, Machala M. Apoptosis and inhibition of gap-junctional intercellular communication induced by LA-12, a novel hydrophobic platinum (IV) complex. *Archives of biochemistry and biophysics* 462.1 2007: 54-61.
183. Kaspárková J, Nováková O, Vrána O, Intini F, Natile G, Brabec V. Molecular aspects of antitumor effects of a new platinum (IV) drug. *Molecular pharmacology* 70.5 2006: 1708-1719.
184. Moretto J, Chauffert B, Ghiringhelli F, Aldrich-Wright JR, Bouyer F. Discrepancy between in vitro and in vivo antitumor effect of a new platinum(II) metallointercalator. *Invest New Drugs.* 2011 Dec;29(6):1164-76

185. Ma Z, Choudhury JR, Wright MW, Day CS, Saluta G, Kucera GL, Bierbach U. A non-cross-linking platinum-acridine agent with potent activity in non-small-cell lung cancer. *J Med Chem.* 2008 Dec 11;51(23):7574-80
186. Komeda S, Takayama H, Suzuki T, Odani A, Yamori T, Chikuma M. Synthesis of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum(ii) complexes with in vivo antitumor efficacy and unique in vitro cytotoxicity profiles. *Metallomics.* 2013 May 1;5(5):461-8
187. Brin EV, Rytenko AN, Uteshev BS. The effect of the complex platinum (IV) compound oxoplatinum on the immune system. *Farmakol Toksikol.* 1990 Sep-Oct;53(5):52-4).

ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

монографска публикација

Тип записа:

текстуални штампани материјал

Врста рада:

докторска дисертација

Аутор:

Др Милош Арсенијевић

Ментор/коментор:

Доц. др Владислав Воларевић доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија

Наслов рада:

Испитивање цитотоксичности комплекса злата и платине на ћелијским линијама аденокарцинома плућа *in vitro* и *in vivo*

Језик публикације:

српски

Језик извода:

српски и енглески

Земља публикавања:

Србија

Уже географско подручје:

Шумадија

Година:

2014.

Издавач:

Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Место и адреса:

ул. Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац

Физички опис рада:

докторска дисертација, 125 страна, 29 слика, 13 графикана, 4 табеле, 5 шема

Научна област:

медицина

Научна дисциплина:

Клиничка и експериментала хирургија/ онкологија

Предметна одредница/ кључне речи

цитотоксичност, карцином плућа, А549 ћелијска линија, LLC1 ћелијска линија, C57BL/6, цисплатина, злато (III) комплекси, платина (IV) комплекси

УДК

Чува се:

Библиотека Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена:

МН

Извод:

Увод: Лечење тумора цисплатином је повезано са бројним нежељеним ефектима и релативно брзим развојем резистенције. Хемиотерапија NSCLC - (*non small cell type*) тумора плућа подразумева примену деривата платине самостално или у комбинацији са другим групама хемиотерапеутика као што су антимераболити фолата. Ово истраживање има за циљ да испита цитотоксичност нових комплекса злата и платине на епителним ћелијама аденокарцинома плућа *in vitro* (ћелијске линије A549 и LLC1). На мишјем моделу експерименталних метастаза тумора плућа испитивано је који комплекси изазивају смрт туморских ћелија *in vivo* и који би комплекс могао даље да се испита као потенцијални терапеутик.

Циљеви: У складу са основним циљем постављени су следећи специфични циљеви:

1. МТТ и LDH тестом испитати потенцијалну цитотоксичност комплекса.
2. Испитати релативни однос некротичне и апоптотске смрти ћелија изазване испитиваним комплексима.
3. Испитати да ли комплекси утичу на смањење већ успостављених метастаза карцинома плућа у мишјем моделу.

Метод: *In vitro* методама овог истраживања је испитивана цитотоксичност деривата злата и платине у лабораторијским условима помоћу МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) теста и LDH (лактат дехидрогеназа) теста. Процент ћелија умрлих апоптозом након излагања комплексима испитана је *flow* цитометријском анализом ћелија бојених *Annexin*-ом V и пропиридијум јодидом. Да би се испитало да ли постоји корелација између резултата добијених у култури ћелија и ефеката у живом систему, урађено је *in vivo* испитивање на анималном моделу за метастазе аденокарцинома плућа. Експерименталне животиње су били C57BL/6 мишеви, мужјаци узраста 6 до 10 недеља којима је интравенски апликовано 5×10^5 LLC1 ћелија у репну вену. Након жртвовања мишевима су уклоњена плућа, јетра, слезина и десни бубрег од којих су начињени парафински исечци и обојени хематоксилин/еозином. Одређиваће се присуство и број метастазау паренхиму плућа и упоређиваће се број метастаза по групама. Такође испитаће се постојање оштећења ткива јетре и бубрега, како у смислу секундарних депозита, тако и у смислу оштећења насталих дејством комплекса. Мишевима су такође уклоњене слезине и, након адекватне припреме, учињена је проточна цитофлуорометрија како би се одредила релативна заступљеност ћелија специфичне и неспецифичне имуности одговорних за антитуморску имуност: Natural killer (NK), NKT, CD8+ цитотоксичних лимфоцита као и CD4+ Т лимфоцита и макрофага у слезини мишева експерименталних и контролне групе.

Резултати: Прикупљени резултати експериментата су дали следеће резултате:

- Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијску линију хуманог карцинома плућа A549 *in vitro*
- Сви испитивани комплекси злата и платине индукују апоптотску смрт ћелијске линије хуманог карцинома плућа A549
- Комплекси платине су цитотоксичнији од цисплатине за ћелијску линију мишјег карцинома плућа LLC1 *in vitro*
- Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијске линије хуманог и мишјег карцинома плућа LLC1 *in vitro*
- PtEn комплекс има слабу анти-туморску активност *in vivo*, али значајно мења целуларни састав слезине мишева који у примили LLC1 туморске ћелије

Закључак: Ови резултати указују:

- Сви испитивани комплекси злата имају снажну анти-туморску активност индукујући апоптотску смрт ћелија хуманог карцинома плућа
- Комплекси платине су цитотоксичнији од комплекса злата за ћелијске линије хуманог и мишјег карцинома плућа *in vitro*
- PtEn комплекс има слабу анти-туморску активност *in vivo*, али значајно мења целуларни састав слезине мишева који су примили LLC1 туморске ћелије

Датум прихватања теме од стране ННВ:

03.10.2013.

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

1. Проф. др Живадин Д. Бугарчић – редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија, председник
2. Проф. др Драган Чановић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
3. Проф. др Данило Војводић – редовни професор Медицинског факултета Универзитета одбране у Београду ВМА, за ужу научну област Имунологија, члан.
4. Проф. др Слободан Милисављевић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан
5. Доц. др Марија Миловановић — доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

monograph

Type of record:

text printed material

Contents code:

PhD thesis

Author:

Miloš Arsenijević, MD.

Menthor/co-mentor

asist. Profesor Vladislav Volarević, MD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
in the scientific field of microbiology and immunology

Title:

The cytotoxicity of the complex of gold and platinum on the lung adenocarcinoma cell lines in
vitro and in vivo

Language of text:

serbian

Language of abstract:

Serbian and English

Country of publication:

Serbia

Locality of publication:

Šumadija

Publication year:

2014.

Publisher:

Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Publication place:

Svetozara Markovića street, No. 69, 34000 Kragujevac

Physical description

PhD thesis, 125 pages, 29 images, 13 charts, 4 tables, 5 schemes

Scientific field:

medicine

Scientific discipline:

Clinical and Experimental Surgery / Oncology

Subject/key words:

citotoxicity, lung cancer, A549, LLC1, C57BL/6, cisplatin, gold (III)complexes, platinum(IV) complexes

UDC**Holding data:**

Library of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Note:

N

Abstract:

Introduction : Cisplatin treatment of tumors is associated with a number of adverse effects and a relatively rapid development of resistance. Chemotherapy of NSCLC - (non- small cell type) lung tumor involves the application of platinum derivatives alone or in combination with other groups of chemotherapeutic anti-metabolites such as folate. This study aims to examine the cytotoxicity of novel gold and platinum complexes in epithelial cells of lung adenocarcinoma in vitro (cell lines A549 and LLC1). In a mouse model of experimental lung metastasis was examined that the complexes cause the death of tumor cells in vivo and that the complex may be further examined as potential therapeutic agents.

Objectives: In accordance with the main objective set out the following specific goals:

1. MTT and LDH cytotoxicity assay are performed to examine the potential of the complex
2. To examine the relative ratio of necrotic and apoptotic cell death induced by the tested complexes
3. To examine whether the complexes affect the reduction of the already established lung metastases in a mouse model.

Methods : The in vitro methods of this study tested the cytotoxicity of a derivative of gold and platinum in the laboratory using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, and LDH (lactate dehydrogenase) test. The percentage of dead cells by apoptosis after exposure to the complex was investigated by flow cytometric analysis of cells stained Annexin-V machine and propidium iodide. In order to investigate whether a correlation exists between the results obtained in cell culture and the effects of the mercury in the system, has been done in vivo examination of an animal model for metastatic adenocarcinoma of the lung. The experimental groups were C57BL / 6 mice, males aged from 6 to 10 weeks was intravenously injected with 5×10^5 LLC1 cells into the tail vein. After sacrificing the mice were removed from the lung, liver, spleen and left kidney of which are made from paraffin embedded and stained with hematoxylin / eosin. Will determine the presence and number metastases lung parenchyma and comparative of the number of metastases per group. You will investigate the existence of tissue damage liver and kidneys, both in terms of secondary deposits, and in terms of damage caused by the activity of the complex. The mice were also removed by the spleen, and after appropriate preparation was made flow cytometry to determine the relative representation of the cell-specific and nonspecific immunity responsible for antitumor immunity: natural killer (NK), NKT, CD8 + cytotoxic lymphocytes and CD4 + T lymphocytes and macrophages in the spleen of the mice of the experimental and control groups.

Results: Aggregated merits of the experiments gave the following results:

- Complexes of platinum are more cytotoxic than gold complexes with the A549 cell line of human lung carcinoma in vitro,
- All of the tested complexes of gold and platinum induced apoptotic death of the cell line of human lung carcinoma A549
- Complexes of platinum are more cytotoxic than cisplatin with the LLC1 murine lung cancer cell line in vitro
- Complexes of platinum are more cytotoxic than gold complex with the cell line of human A549 and murine lung carcinoma LLC1 in vitro

- PTEN complex has a weak anti - tumor activity in vivo , but significantly changes the cellular composition of the spleen of mice which received the LLC1 tumor cells

Conclusion: These results indicate:

- All tested gold complexes have a strong anti-tumor activity by inducing apoptotic cell death of human lung carcinoma
- The platinum complexes are more cytotoxic than the gold complex with the cell line of human and murine lung carcinoma in vitro
- PTEN complex has a weak anti-tumor activity in vivo, but significantly changes the cellular composition of the spleen of mice that received tumor cells LLC1

Accepted by the Scientific Board on:

03.10.2013.

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

1. Prof. Živadin D. Bugarčić - Professor, Faculty of Natural Sciences, University of Kragujevac in the scientific field of inorganic chemistry , President
2. Prof. Dragan Čanović, MD - Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac in the scientific field of surgery, Member
3. Prof . Danilo Vojvodić, MD - professor of the Medical Faculty of the University of Defence in Belgrade Military Medical Academy , in the scientific field Immunology, Member
4. Prof . Slobodan Milisavljević, MD - Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac in the scientific field of surgery, Member
5. Assis. Prof. Marija Milovanovic, MD - Assistant Professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac in the scientific field of microbiology and immunology, Member

8.6 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Милош Арсенијевић
Датум и место рођења: 05.02.1983. год. Крагујевац
Садашње запослење: лекар на специјализацији грудне хирургије у КЦ Крагујевац; сарадник у настави на Катедри Хирургије Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Испитивање цитотоксичности комплекса злата и платине на ћелијским линијама аденокарцинома плућа <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
Број страница: 125
Број слика: 29
Број библиографских података: 187
Установа и место где је рад израђен: Факултат медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу,
Научна област (УДК): медицина
Ментор: Доц. др Владислав Воларевић доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 21.06.2013.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-533/20 03.10.2013.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Доц. др Владислав Воларевић доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија 2. Проф. др Живадин Бугарчић – редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија 3. Проф. др Данило Војводић – редовни професор Медицинског факултета Универзитета одбране у Београду ВМА, за ужу научну област Имунологија 4. Проф. др Слободан Милисављевић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија 5. Доц. др Марија Миловановић – доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. Проф. др Живадин Бугарчић – редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија, председник

2. Проф. др Драган Чановић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

3. Проф. др Данило Војводић –редовни професор Медицинског факултета Универзитета одбране у Београду ВМА, за ужу научну област Имунологија, члан.

4. Проф. др Слободан Милисављевић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

5. Доц. др Марија Миловановић — доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Комисија за одбрану докторске дисертације:

1. Проф. др Живадин Бугарчић – редовни професор Факултета природних наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Неорганска хемија, председник

2. Проф. др Драган Чановић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

3. Проф. др Данило Војводић –редовни професор Медицинског факултета Универзитета одбране у Београду ВМА, за ужу научну област Имунологија, члан.

4. Проф. др Слободан Милисављевић – ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан

5. Доц. др Марија Миловановић — доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Датум одбране дисертације:

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милош Арсенијевић
број уписа 2008/26

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОСМОПЛЕКСА ЗАГА СЕ
ПЛАТИНЕ НА РАЧУНСКИМ МОДЕЛИМА АДЕНОКАРЦИНОМА ПУТА МИТРО И МИСО

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Крагујевцу, МАРТ 2014.

Потпис аутора

Милош Арсенијевић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милош Арсенијевић
Број уписа 2008/26
Студијски програм Клиничка и експериментална неврологија
Наслов рада Испитивање истоветности штампане и електронске верзије докторског рада на тему: Истраживање ефеката левог и десног полуплохне на функцију левог и десног полуплохне
Ментор Дец. Др Владислав Волачевић
Потписани Милош Арсенијевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

У Крагујевцу, МАРТ 2014.

Потпис аутора

Милош Арсенијевић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ КИТОТЕКСИЧНОСТИ ПОШТЕЊЕСА ЗЛАТА И ПРАТИНЕ НА БЕЛЦИЈЕСКИ
ЛИШИЈЕСА АДЕНОКАРЦИНОМА ПЛУЋА ММТРО И ММТНО
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, МАРТ 2014.

