



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Дејан Лазић

**ЦИТОТОКСИЧНОСТ НОВОСИНТЕТИСАНИХ
КОМПЛЕКСА РУТЕНИЈУМА У МОДЕЛУ КАРЦИНОМА
КОЛОНА КОД МИШЕВА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор др сци. мед. Драгче Радовановић, ванредни професор

Крагујевац, 2018. године

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Дебело црево- анатомија и функционалне карактеристике.....	3
1.1.1. Анатомија дебелог црева	3
1.1.2. Функционалне карактеристике дебелог црева	7
1.2. Колоректални карцином	8
1.2.1. Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома	8
1.2.2. Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома.....	14
1.2.2.1. Фактори ризика подложни превенцији	14
1.2.2.2. Непроменљиви фактори ризика	20
1.2.3. Карциногенеза колоректалног карцинома	24
1.2.4. Клиничка презентација колоректалног карцинома.....	32
1.2.4.1.Симптоматологија.....	32
1.2.5. Дијагноза, дијагностичке процедуре и скрининг колоректалног карцинома	34
1.2.5.1. Клиничка дијагностика.....	34
1.2.5.2. Хистопатолошки аспекти колоректалног карцинома.....	42
1.2.5.2.1. Хистопатолошки типови колоректалног карцинома	42
1.2.5.2.2. Хистолошки градус	47
1.2.5.2.3. Патолошки стадијум болести.....	48
1.2.6. Лечење колоректалног карцинома.....	54
1.2.6.1. Хируршки третман	55
1.2.6.1.1. Хируршко лечење карцинома колона	55
1.2.6.1.2. Хируршко лечење карцинома ректума	57
1.2.6.1.3. Хируршко лечење локалних рецидива колоректалног карцинома	59
1.2.6.1.4. Хируршко лечење метастаза колоректалног карцинома.....	61
1.2.6.2. Хемотерапија	63
1.2.6.2.1. Адјувантна хемотерапија колоректалног карцинома	64
1.2.6.2.2. Хемотерапија колоректалног карцинома са синхроним метастазама.....	66
1.2.6.2.3. Новине у хемотерапији колоректалног карцинома	68
1.3. Рутенијум	68
1.4. Антитуморски комплекси рутенијума.....	70
1.5. Комплекси рутенијума(III).....	73

1.5.1. NAMI-A	74
1.5.1.1. Механизам деловања	75
1.5.2. KP1019.....	76
1.5.2.1. Механизам деловања	77
1.6. Органометални рутенијум(II) арена комплекси.....	77
1.6.1. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама	80
1.6.2. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са олигонуклеотидима и ДНК	81
1.6.3. Реакције са аминокиселинама и протеинима	82
1.7. Рутенијум(II) полипиридил комплекси	84
2. ЦИЉЕВИ.....	88
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	89
3.1. Синтеза комплекса.....	89
3.1.1. Синтеза прекурсора.....	89
3.1.2. Општи поступак за синтезу $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]\text{Cl}$ ($1_{\text{Cl}} - 4_{\text{Cl}}$) комплекса:.....	89
3.1.3. Синтеза $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}_3]$ комплекса ($\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}} = 2,6\text{-бис}(5\text{-терц-бутил-1Н-пиразол-3-ил})\text{пиридин}$).....	92
3.2. Мерења	93
3.2.1. Елементална анализа.....	93
3.2.2. UV-Vis спектрофотометријска анализа.....	93
3.2.3. IR спектроскопска анализа	93
3.2.4. NMR спектроскопска анализа	93
3.2.5. Рендгенска структурна анализа	94
3.2.6. Кинетичка мерења.....	95
3.2.7. Квантно хемијска метода.....	95
3.2.8. Липофилност	95
3.3. Интеракције комплекса са ДНК.....	96
3.3.1. Абсорпциона спектроскопска испитивања.....	96
3.3.2. Флуоресцентна испитивања	96
3.3.3. Мерење вискозитета.....	96
3.4. Биолошка мерења	97
3.4.1. Ћелијске културе	97
3.4.2. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест	98
3.4.3. Квантитативно испитивање апоптоске смрти <i>Annexin V-FITC</i> тестом апоптотичности	99

3.4.4. Анализа ћелијског циклуса	100
3.4.5. Мерење експресије Noxa и Ki-67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом	101
3.5. Методе за испитивање антитуморске активности комплекса рутенијума <i>in vivo</i>	101
3.5.1. Експерименталне животиње	101
3.5.2. Експериментални модел карцинома колона	102
3.5.3. Израда патохистолошких препарата	103
3.5.3.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	103
3.5.3.2. Верификација броја и величине метастатских колонија	104
3.5.4. <i>In situ</i> детекција фрагментације ДНК	104
3.5.5. Изолација моноклеарних ћелија из слезине	104
3.5.6. Анализа популација моноклеарних ћелија слезине методом проточне цитометрије	105
3.5.7. Испитивање потенцијално токсичних ефеката комплекса рутенијума	106
3.6. Статистичка обрада података	106
4. РЕЗУЛТАТИ	107
4.1. Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса.....	107
4.1.1. Елементална микроанализа рутенијум(II) терпиридин комплекса	109
4.1.2. Електронски апсорбциони спектри рутенијум(II) терпиридин комплекса	110
4.1.3. Инфрацрвени спектри рутенијум(II) терпиридин комплекса	110
4.1.4. NMR спектри рутенијум(II) терпиридин комплекса	110
4.1.5. Кристална структура [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl]Cl комплекса (3).....	112
4.2. UV-Vis испитивање реакције комплекса 1 и 2 са аминокиселином L-хистидин	113
4.3. Интеракције комплекса са ДНК.....	117
4.3.1. Електронска апсорпциона спектроскопија	117
4.3.2. Флуоресцентна испитивања	120
4.4. <i>In vitro</i> антиканцерогена активност комплекса 1 – 4.....	123
4.5. Новосинтетисани комплекс рутенијума [Ru(H₂L^{t-Bu})Cl₃] смањују вијабилност ћелија мишјег карцинома колона CT26 <i>in vitro</i>	123
4.6. [Ru(H₂L^{t-Bu})Cl₃] комплекс изазива апоптотску смрт CT26 ћелија.....	127
4.7. [Ru(H₂L^{t-Bu})Cl₃] комплекс испољава антипролиферативни ефекат на CT26 ћелије	130

4.7.1. Анализа ћелијског циклуса	132
4.8. Антитуморски ефекат $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекса <i>in vivo</i> у хетеротопском моделу карцинома колона миша.....	134
4.8.1. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс повећава преживљавање мишева са примарним тумором	134
4.8.2. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује раст примарног тумора	135
4.8.3. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује метастазирање примарног тумора.....	137
4.8.4. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс не испољава токсичност.....	141
5. ДИСКУСИЈА.....	144
5.1. Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса.....	144
5.2. UV-Vis испитивање реакције комплекса 1 и 2 са аминокиселином L-хистидин	145
5.3. Интеракције комплекса са ДНК.....	146
5.4. <i>In vitro</i> антиканцерогена активност комплекса 1 – 4.....	147
5.5. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује вијабилност ћелија мишијег карцинома колона СТ26 <i>in vitro</i>	148
5.6. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс изазива апоптотску смрт СТ26 ћелија.....	153
5.7. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс повећава проценат Noxa+ СТ26 ћелија	154
5.8. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује метастазирање примарног тумора.....	155
5.9. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс не испољава токсичност	158
6. ЗАКЉУЧЦИ	162
7. ЛИТЕРАТУРА.....	164

1. УВОД

Колоректални карцином (*CRC-colorectal cancer*), на глобалном нивоу, је трећи најчешће дијагностиковани рак у мушкој и други по учесталости у женској популацији, са процењених 1,4 милиона нових случајева и скоро 700.000 смртних исхода у 2012. години. (1) Епидемиолошке студије су показале да је више од две трећине свих случајева и око 60% свих смртних исхода од CRC-а заступљено у земљама са високим или веома високим степеном економског развоја. (2) Сматра се да је учесталост CRC-а један од најјаснијих показатеља транзиције земаља у којима се заједно с друштвеним и економским променама усваја и западњачки начин живота (*western lifestyles*). (3) Стопе инциденције CRC-а и стопе смртности убрзано расту у многим земљама са ниским и средњим приходима. Трендови стабилизације или опадања се могу регистровати у високо развијеним земљама где стопе остају међу највишим у свету. Процењује се да ће број оболелих од колоректалног карцинома до 2030. године порастати за 60%, што ће износити око 2,2 милиона нових случајева и 1,1 милион смртних исхода од рака колоректума годишње. (4) Актуелни тренд је присутан и у нашој популацији. У Србији је 2012. године забележено 5.513 нових случајева колоректалног карцинома, а број умрлих је процењен на 3.135 што представља 12,1% од укупног броја смртних случајева узрокованих раком на територији наше земље. (5)

Генетска испитивања, експерименталне и епидемиолошке студије сугеришу да је етиологија колоректалног карцинома резултат комплексне интеракције између наследне предиспозиције и фактора животне средине. Неки фактори ризика, попут пушења, су подложни промени, међутим други, попут старосне доби или позитивне породичне анамнезе, се не могу мењати. Перзистентни фактори ризика не значе сигурну болест. Напротив, неке особе оболевају од рака колоректума, а немају доказане факторе ризика. (6,7,8,9,10)

Прогноза оболелих од CRC-а зависи од стадијума болести у тренутку дијагностиковања, локалног стадијума тумора, нодалног статуса и постојања удаљених метастаза. Упркос примени правилних хируршких техника, напретку неoadјувантне и адјувантне терапије и усавршених метода одређивања хистопатолошког стадијума, скоро половина оболелих ће развити рецидив болести. (11) Стопа петогодишњег преживљавања оболелих од CRC-а који имају метастазе (III стадијум болести) износи

само 10% (12) што се, између осталог, објашњава развојем резистенције на класичне хемотерапеутике.

У периоду од 1990- 1995. године по први пут је презентован, а затим и потврђен значај примене адјувантне хемотерапије базиране на флуороурацилу, те њеног значајног утицаја на период преживљавања оболелих од колоректалног карцинома у III стадијуму болести. (13, 14, 15)

Данашње европске *ESMO (European Society of Medical Oncology)* и светске препоруке као стандардни приступ у лечењу III стадијума колоректалног карцинома наводе дублет састављен од оксалиплатине и 5FU/LV (*5 fluorouracil/ leucovorin*). Комбинација 5FU (*5 fluorouracil*) и оксалиплатине је супериорнија од само 5FU у погледу преживљавања без знакова болести (*DFS- disease free- survival*) и укупног преживљавања (*OS- overall survival*) оболелих од колоректалног карцинома. (16) Упркос чињеници да је клиничка примена оксалиплатине повећала преживљавање оболелих од узрапредовалог карцинома дебелог црева, (17) у 40% случајева долази до развоја терапијске резистенције. (18) Сензорна неуропатија услед кумулативне неуротоксичности и друга нежељена дејства оксалиплатине (19) и развој резистенције на лек су условили развој нових тераписјких стратегија у лечењу колоректалног карцинома. Резултат тога су стална истраживања у циљу открића *non-platinum* лекова на бази метала који имају шири спектар дејства уз мање нежељених ефеката. (20)

У потрази за лековима који нису на бази платине, рутенијум заузима важно место, нарочито због мање токсичности и веће селективности према ћелијама канцера. (21) Комплекси рутенијума представљају нову породицу антиканцерогених лекова који показују обећавајући потенцијал антитуморског дејства. Ови комплекси имају нов механизам деловања, мању вероватноћу развоја резистенције и имају другачији спектар деловања у односу на комплексе платине. (22, 23, 24) Механизам антиканцерогеног деловања комплекса рутенијума заснива се на спречавању настанка метастаза, (25) интеракцији комплекса са ДНК (26) и протеинима (27), производњи реактивних врста кисеоника, (28) инхибицији активности топоизомеразе (29) и индукцији апоптозе. (30) Такође, истраживања су показала да антиканцерогена активност комплекса зависи од природе и структуре хелатних лиганата који се налазе у координираној сфери комплекса, као и од присуства одлазеће групе која је обично хлорид. (31) Испитивања су доказала да комплексни рутенијума имају мање нежељених ефеката у поређењу с

комплексима платине. Поједине биохемијске и патохистолошке студије су чак доказале хепато- и рено- протективно дејство комплекса рутенијума. (32)

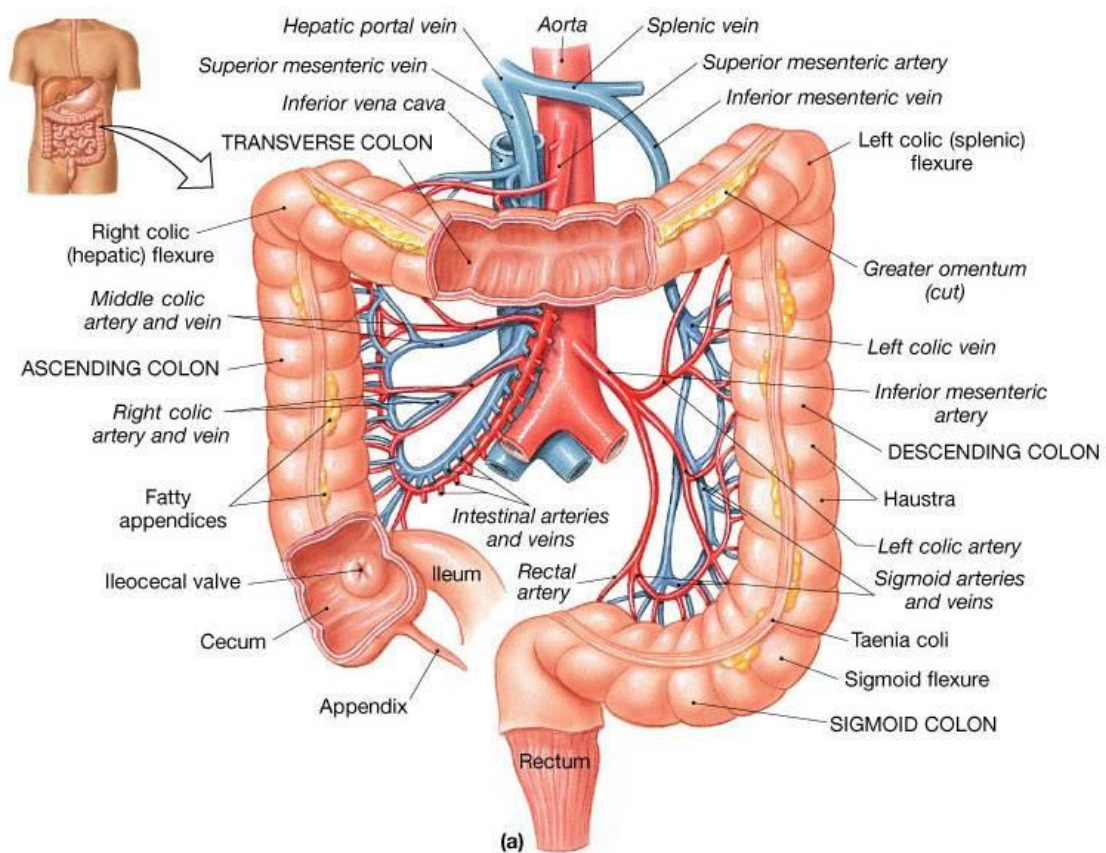
С обзиром да комплекси рутенијума показују значајне предности у односу на комплексе платине (другачији механизам антитумореке активности, мања вероватноћа развоја резистенције, другачији спектар дејства, мања токсичност) задатак ове студије је испитивање потенцијалног цитотоксичног ефекта новосинтетисаног рутенијум(III) комплекса $[Ru(H_2L^{tBu})Cl_3]$ где $H_2L^{tBu} = 2,6$ -бис(5-терц-бутил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин), *in vitro* на ћелијама мишијег карцинома колона (СТ26) и антитуморски ефекат *in vivo* у моделу карцинома дебелог црева миша.

1.1. Дебело црево- анатомија и функционалне карактеристике

1.1.1. Анатомија дебелог црева

Дебело црево (лат. *intestinum crassum*) је завршни део дигестивног тракта дужине око 150cm. Наставља се на танко црево и пружа се од илеоцекалне валвуле (лат. *valvula ileocecalis*) до зупчате линије у аналном каналу и уоквирује простор трбушне дупље испуњен вијугама танког црева. Анатомски јасно издвојени делови дебелог црева су црвуљак (лат. *appendix vermiformis*), слепо црево (лат. *caecum*), усходни колон (лат. *colon ascendens*), хепатичка флексура (лат. *flexura coli hepatis*), попречни колон (лат. *colon transversum*), лијенална флексура (лат. *flexura coli lienalis*), нисходни колон (лат. *colon descendens*), сигмоидни колон (лат. *colon sigmoideum*) и чмарно црево (лат. *rectum*). Попречни и сигмоидни колон имају свој мезентеријум (перитонеална дупликатура), док усходни и нисходни колон имају свој мезентеријум тек код 12, односно 22 одсто људи, иначе су слепљени за задњи трбушни зид (33). Црвуљак (34) је слепи завршетак дебелог црева који полази од задњег дела медијалног зида цекума. Калибар црвуљка не прелази 7mm, док је просечна дужина око 8cm, уз велике индивидуалне варијације. Цекум (34) је смештен у десној бедреној јами, попречног је дијаметра 8-10cm, и дужине око 8cm. усходни колон заузима десни бочни део трбушне шупљине. Дугачак је око 10cm и ширине лумена од 8cm (у почетном делу) до 5cm, колико износи калибар на хепатичкој флексури. Попречни колон (34) се пружа попречно од десног до левог хипохондријума. Дужина попречног колона је око 50cm, а калибар око 5cm. Нисходни колон је смештен и левом бочном делу трбушне шупљине и управљен је од лејеналне флексура дебелог црева, наниже, до нивоа горње апертуре

мале карлице где се наставља сигмоидним делом дебелог црева. Дужина десцендентног колона варира од 12 до 25cm, а калибар од 3 до 4cm. Сигмоидни колон је смештен у карличној дупљи, и има облик ћириличног слова „С“. Дужина сигмоидног колона да варира од 50, па до чак 100cm, док је калибар око 3cm. Последњи део колона је чмарно црево или ректум. Дужина ректума је око 12 до 15cm и варијабилног је калибра. Лумен ректума је у средњем делу проширен, тзв. ампула ректума (лат. *ampulla recti*). У њему се сакупља фецес пре његове елиминације кроз анус. Способност ампуле да се релаксира како би се прилагодила првобитном и каснијем доласку фекалног садржаја је један од есенцијалних елемената очувања фекалног континуитета.



Слика 1. Анатомија дебелог црева и ректума (извор: F.H. Netter, *Atlas of Human Anatomy*, 5th edn. Saunders, Philadelphia, 2010)

Карактеристичне морфолошке структуре видљиве на површини дебелог црева су (34):

- *taeniae coli*- уздужне траке, представљају збијене снопове уздужног слоја (*stratum longitudinale*) мишићног омотача дебелог црева. Постоје 3 уздужне траке, све три полазе од ушћа црвуљка у слепо црево. Одатле се пењу уз слепо црево и усходни колон, затим се пружају даље дуж попречног, нисходног и сигмоидног дела дебелог црева и исчезавају у пределу чмарног црева. Теније дебелог црева су: а) *taenia libera*, б) *taenia omentalis* и в) *taenia mesocolica*.
- *haustrea coli*- мехураста испупчења, мали уврати (кесе). Налазе се између тенија и дебелом цреву дају карактеристичан клобучаст изглед.
- *sulci transversi*- попречни жљебови на спољашњој површини дебелог црева одвајају два суседна мехураста испупчења и дају дебелом цреву сегментални изглед (изглед бројаница). Попречни жљебови на луминалној страни дебелог црева стварају полумесечасте гребене (лат. *plicae semilunares*)
- *appendices epiploicae*- масне ресице (*appendices epiploicae*) представљају перитонеалне изврате у виду прста на рукавици, који су испуњени машћу. Налазе се дуж тенија.

Уздужне пантљике се пружају од ушћа црвуљка у цекум до ректума. Цекум, асцедентни и попречни колон имају три теније, а десцедентни колон и сигма две. На ректуму лонгитудинални мишићни слој поново обухвата целу циркумференцију црева, тако да теније више не постоје.

У раним фазама ембрионалног развоја дебело црево је у потпуности обавијено перитонеумом, изузев ректума који се налази испод дна перитонеалне дупље. Касније, усходни и нисходни колон се приљубљују уз задњи трбушни зид и постају секундарно ретроперитонеални органи. Дакле, по завршетку ембрионалног развоја дебело црево је делом интраперитонеалан (слепо црево и сигмоидни колон), делимично секундарно ретроперитонеалан (усходни и нисходни колон), а делом и субперитонеалан орган (чмарно црево- ректум). Интраперитонеални делови дебелог црева имају своју перитонеалну петелку. Она их спаја са задњим трбушним зидом и омогућава њихову покретљивост. Секундарно ретроперитонеални делови дебелог црева су непокретни и везани су за задњи трбушни зид Толдтовим фасцијама.

Васкуларизација (34). Црвуљак, усходни колон и десну половину попречног колона исхрањује горња мезентерична артерија (*a. mesenterica superior*), преко својих

десних грана: *a. ileocolica*, *a. colica dextra* и *a. colica media*. Остали део колона, све до горње трећине ректума, је васкуларизован преко доње мезентеричне артерије (*a. mesentericae inferior*), кроз њене гране: *a. colica sinistra*, *aa. sigmoideae* и *a. rectalis superior*. Доње две трећине ректума исхрањују *a. rectalis media* и *a. rectalis inferior*, гране *a. iliacaе internaе*. Артерије колона, изузев на нивоу ректума, се на удаљености од око 3 до 6 цм од зида колона спајају у параколичну аркаду. Од аркаде, на размацама од 2 до 3 цм, одвајају се праве артеријске гранчице које иду до зида колона, и пре него што га дотакну, поделе се на две још тађе артеријске гранчице, од којих једна иде преко предње, а друга преко задње површине колона и исхрањује је. Вене дебелог црева су пратиље истоимених артерија и уливају се у вену порте. Крв из горњег и средњег дела ректума се дренира преко горње ректалне вене у портни крвоток, док се из доњег дела ректума венска крв дренира кроз хемороидални плексус преко средње и доње ректалне вене и унутрашње илијачне вене у доњу шупљу вену (35).

Лимфни систем дебелог црева чине лимфни судови који одводе лимфу до око тридесетак регионалних лимфних чворова (*nodi lymphatici mesocolici*). Из ових лимфних нодуса еферентни лимфни судови одводе лимфу до мезентеријалних жлезда (*nodi lymphatici mesenterici*) (36).

Инервација. Читаво дебело црево изузев две дисталне трећине ректума прима аутономну инервацију из целијачног плексуса (*plexus coeliacus*) преко две његове гране: *plexus mesentericus superior* и *plexus mesentericus inferior*. Две дисталне трећине ректума инервише *plexus pelvinus*. Када су у питању парасимпатичка влакна у оквиру аутономне инервације колона, она у проксималном делу (до лијеналне флексури) потичу од вагусног нерва, а у дисталном од центара парасимпатикуса у бочним роговима сакралних сегмената кичмене мождине. (33, 34)

Зид колона има четири слоја: слузокожу, подслузокожу (субмукозу), мишићни слој и серозу. Слузокожа се састоји од епитела, *lamina propriae* (подепителни слој мукозе сачињен од везивног ткива) и *laminae muscularis mucosae* (танак мишићни слој саме слузокоже, који има два подслоја: циркуларни унутра и лонгитудинални споља). У једнослојном епителу колона доминирају две врсте ћелија: ентероцити са рудиментарним микровилима и пехарасте ћелије које стварају слуз. Епител прави уврате у подепителни слој, које називамо криптама. Пехарасте ћелије доминирају у криптама, а ентероцити на површинама између крипти. Пехарастих ћелија има све више ка дисталном делу колона, јер је потребно све више слузи да обложи чврст

фекални садржај. На дну крипти се налазе матичне ћелије које се константно деле, и чији се „потомци“ диферентују у ентероците или пехарасте ћелије. У криптама се могу наћи и ретке ендокрине ћелије, које су бројније у проксималним деловима дебелог црева (37). У подепителном слоју мукозе се могу наћи групе лимфоцита које понегде формирају праве лимфне чвориће. Већи лимфни чворићи пролазе кроз *lamina-у muscularis mucosae* до у субмукозни слој. Субмукозни слој нема својих посебних особености. У њему доминирају везивне ћелије, али су ту смештени и неурони и нервна влакна субмукозног нервног плексуса (*plexus submucosus Meissneri*). Мишићни слој зида колона има два подслоја: лонгитудинални, који постоји само као део тенија, и циркуларни подслој, који обухвата цео лумен колона. Између ових слојева смештен је миентерички нервни плексус (*plexus myentericus Auerbachii*). Серозни слој се састоји од везивног ткива, прекривеног мезотелним ћелијама у једном слоју.

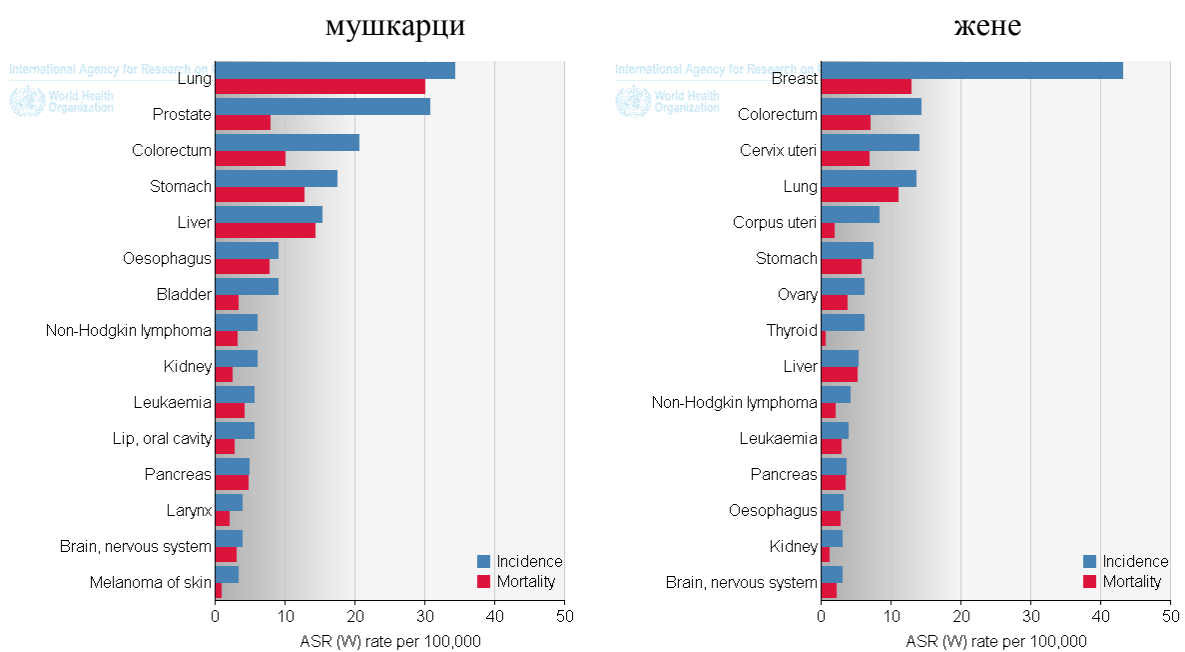
1.1.2. Функционалне карактеристике дебелог црева

Основне функције дебелог црева су апсорбција воде и електролита и транспорт и евакуација неапсорбованог фекалног садржаја. У цекум сваког дана доспе око 1000 милилитара течног химуса, од чега се само 100 милилитара излучи фецесом. Процесом апсорбције и секреције течности и електролита уз бактеријску активност колиформне флоре дневно се произведе око 200 грама чврстог фекалног садржаја. Процеси апсорбције се првенствено одвијају у усходном делу колона. У варењу учествују бројне колиформне бактерије које опстају захваљујући води и хранљивим материјама из химуса. Колиформне бактерије разграђују протеине и аминокиселине до продуката који су одговорни за карактеристичан мирис столице (индол, скатол, водоник- сулфид, масне киселине). Такође, разграђују и жучне боје до продуката који столицу дају карактеристичну браон боју. Међутим, под дејством колиформних бактерија се стварају и неке важне материје као што су витамин Б12, витамин К, тиамин и рибофлавин. (38)

1.2. Колоректални карцином

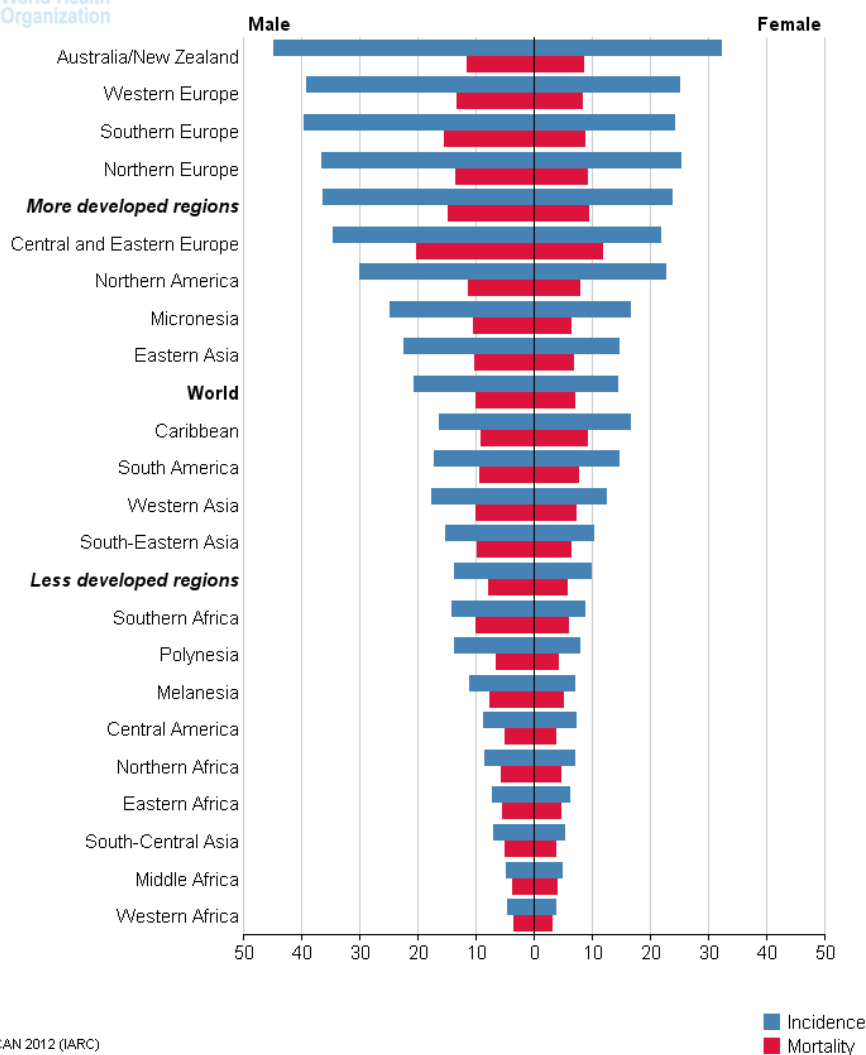
1.2.1. Епидемиолошке карактеристике колоректалног карцинома

Колоректални карцином, на глобалном нивоу, је трећи најчешће дијагностиковани рак у мушкој (иза рака плућа и рака простате) и други по учесталости у женској популацији (иза рака дојке), са процењених 1,4 милиона нових случајева и скоро 700.000 смртних исхода у 2012. години (Графикон 1). (1)



Графикон 1. Инциденца и морталитет колоректалног карцинома у свету, по половима, за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

Према последњим подацима преузетим из базе "Глобокана" за 2012. годину највише стопе инциденце обољевања од колоректалног карцинома су забележене у Аустралији и Новом Зеланду, Европи, Северној Америци и источној Азији, а најниже у јужној Азији и Африци (Графикон 2). (2)

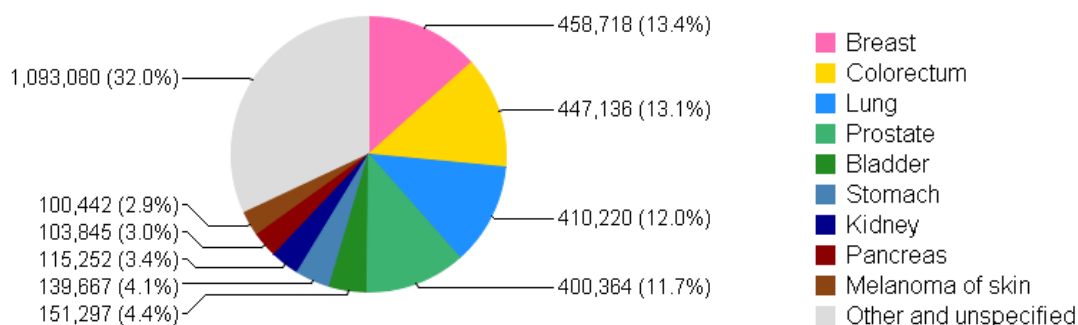


GLOBOCAN 2012 (IARC)

Графикон 2. Процењена инциденца и морталитет од колоректалног карцинома у свету за 2012. годину на 100.000 становника (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

У Европи је 2012. године забележено 447.136 нових случајева CRC-а, што је 13% свих карцинома код Европљана, при чему је колоректални карцином други по учесталости, одмах после карцинома дојке (Графикон 3).

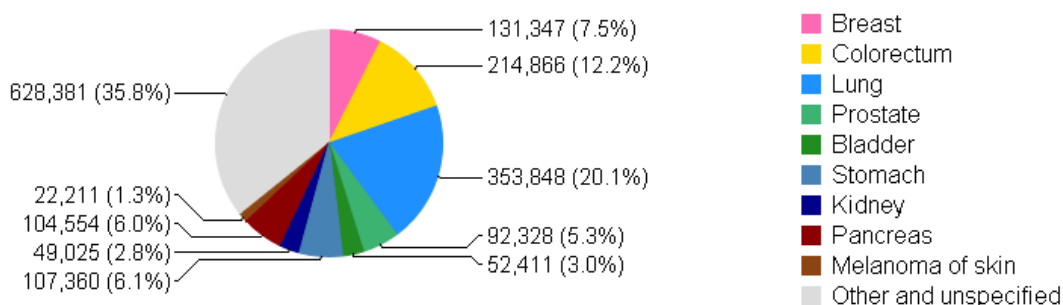
Incidence



Графикон 3. Инциденца колоректалног карцинома у Европи за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

Број умрлих у истој години је процењен на 214.866, што представља 12,2% од укупног броја смртних случајева узрокованих раком на европском континенту (Графикон 4).

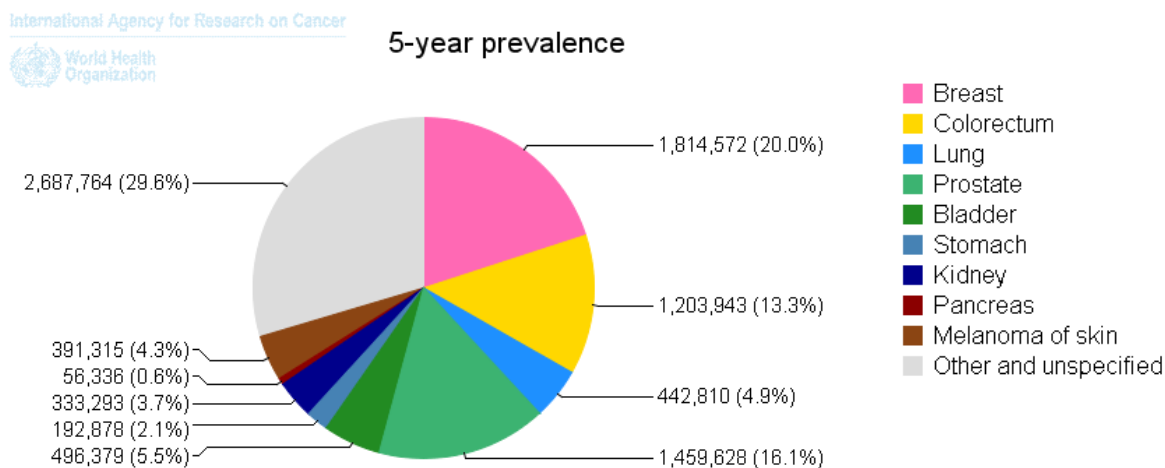
Mortality



Графикон 4. Морталитет од колоректалног карцинома у Европи за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

Петогодишња преваленца CRC-а (број пацијената оболелих од CRC-а с петогодишњим преживљавањем после постављања дијагнозе) процењена је на

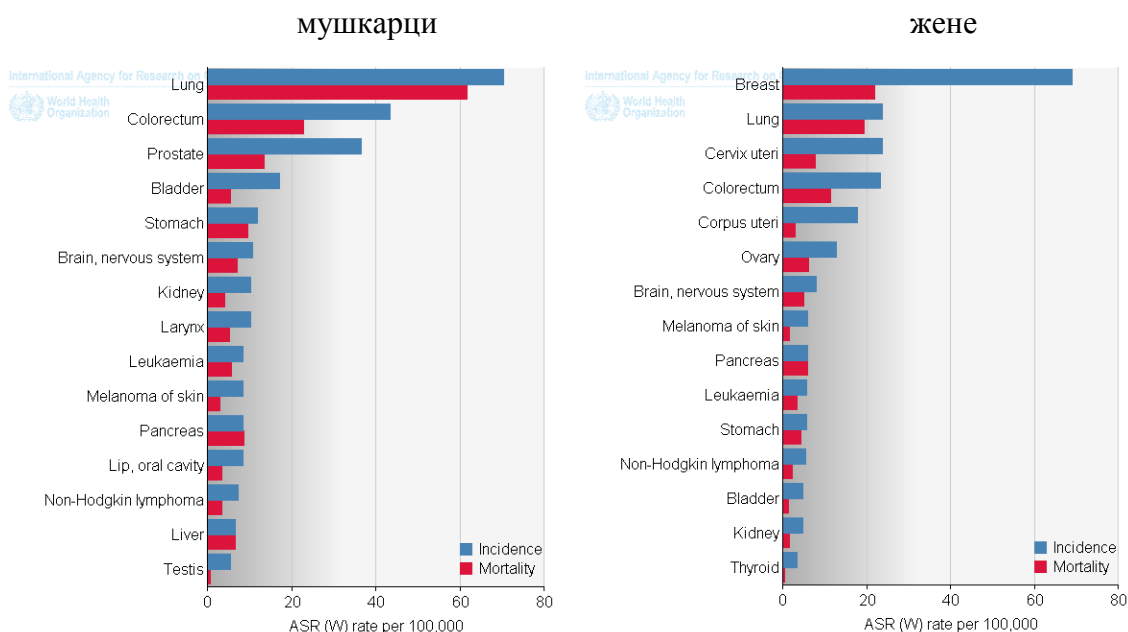
3.543.582 болесника у свету (68,2 преживелих на 100.000 становника), и 1.203.943 у Европи (192,3 преживелих на 100.000 становника) (Графикон 5).



Графикон 5. Петогодишња преваленца колоректалног карцинома у Европи за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

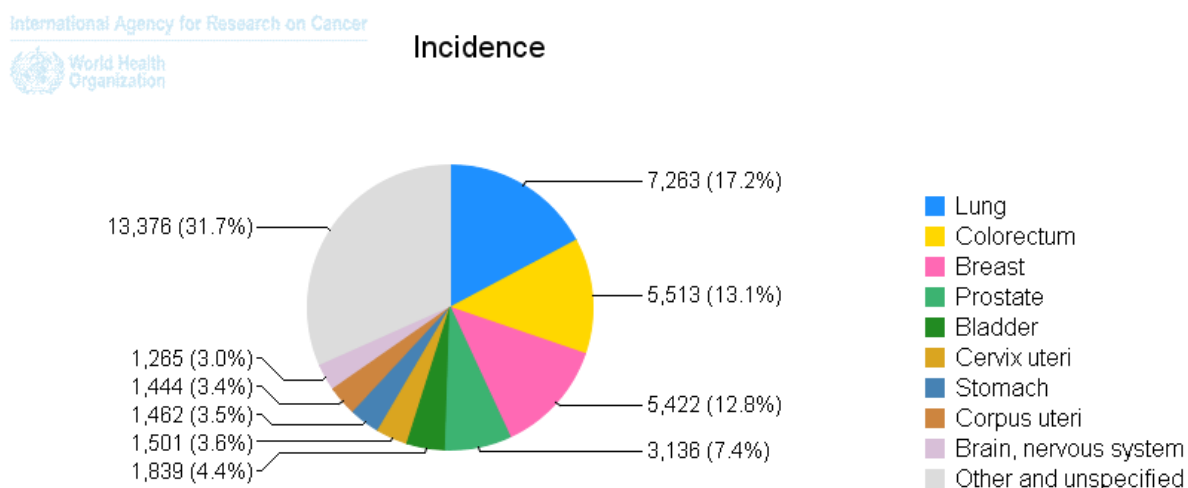
Кумулативни ризик од CRC-а код особа млађих од 75 година је у 2012. години био 1,95% на глобалном нивоу (2,36% код мушкараца и 1,57% код жена) и 3,51% на европском континенту (4,48% код мушкараца и 2,73% код жена). (2)

Према подацима из исте базе података за Србију, рак колоректума је други водећи узрок оболевања у мушкој (иза рака плућа) и четврти у женској популацији (иза рака дојке, плућа и грлића материце) (Графикон 6).



Графикон 6. Процењена инциденца и морталитет од колоректалног карцинома у Србији за 2012. Годину, по половима, на 100.000 становника (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

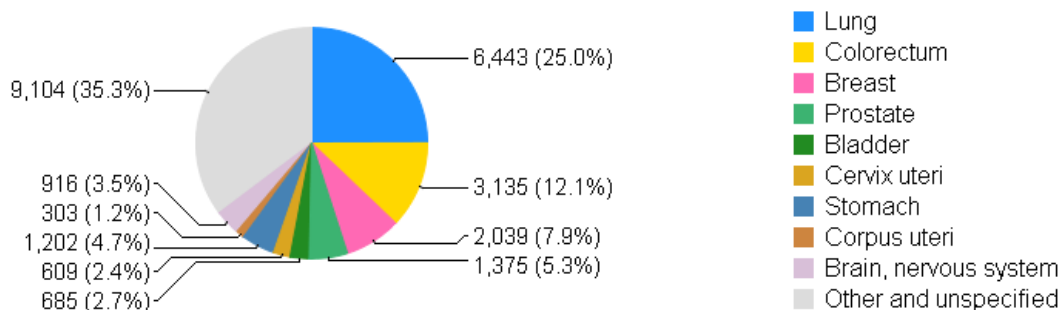
У нашој земљи стандардизована стопа инциденције (на 100.000 становника) за рак колоректума износи 32,6 за целокупну популацију (43,4 за мушкарце и 23,3 за жене). У 2012. години у Србији је забележено 5.513 нових случајева CRC-а, што је 13,1% свих карцинома у популацији одраслих (Графикон 7).



Графикон 7. Инциденца колоректалног карцинома у Србији за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

Број умрлих у истој години је процењен на 3.135 што представља 12,1% од укупног броја смртних случајева узрокованих раком у Србији (Графикон 8).

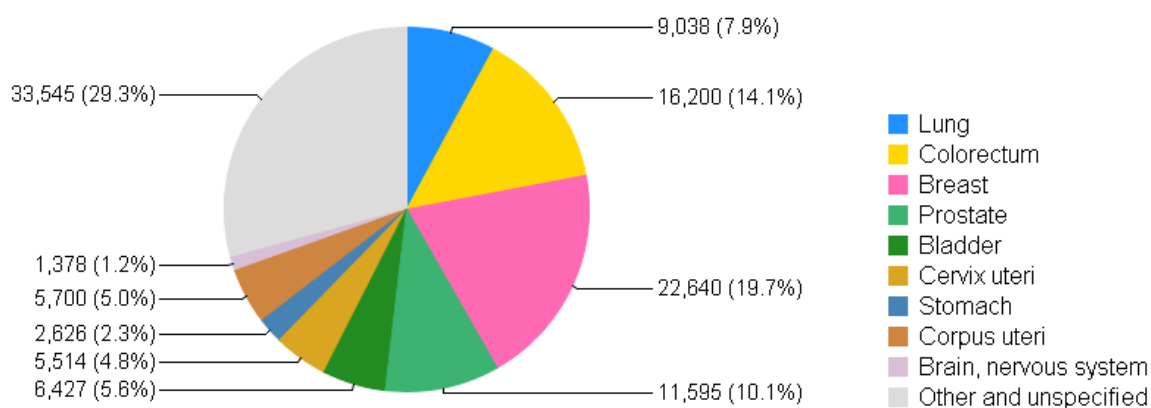
Mortality



Графикон 8. Морталитет од колоректалног карцинома у Србији за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

Петогодишња преваленца CRC-а у нашиј земљи је процењена на 16.200 болесника (199,2 преживелих на 100.000 становника) (Графикон 9).

5-year prevalence



Графикон 9. Петогодишња преваленца колоректалног карцинома у Србији за 2012. годину (извор: International Agency for Research on Cancer. WHO. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.)

Резултати Интернационалне агенције за истраживање рака (IARC) из 2012. године показују да је по учесталости обољевања од колоректалног карцинома Србија на 13. месту међу европским земљама, док је по смртности на 6. месту у Европи, одмах после Мађарске, Хрватске, Словачке, Словеније и Републике Чешке.

Подаци Регистра за рак Института за јавно здравље Србије "Др Милан Јовановић Батут" из 2013. године показују да је колоректални карцином у Србији други најчешћи карцином и код мушкараца и код жена, док је други водећи узрок смрти од малигних болести код мушкараца, а трећи код жена. Према овим подацима, број новодијагностикованих случајева колоректалног карцинома исте године је био 4.115 (2.472 мушкараца и 1.641 жена) и умрло је 2.621 особа оба пола (1.618 мушкараца и 1.003 жене).

1.2.2. Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома

1.2.2.1. Фактори ризика подложни превенцији

Бројне студије сугерушу да начин исхране може утицати на настанак CRC-а, те је од великог значаја боље разумевање дијететских фактора који могу бити повезани с ризиком од обољевања. Подаци епидемиолошких студија указују на статистички значајну повезаност исхране богате мастима и протеинима, првенствено животињског порекла, и инциденце CRC-а (39). У земљама Запада где је стопа обољевања и највећа, масти чине 40–50 % укупног калоријског уноса. (40) Истраживања *Doerner-ове* и сарадника (41) показала су да масти у исхрани експерименталних мишева промовишу инфламаторне процесе у дигестивном тракту и малигнитет независно од гојазности, али зависно од врсте унетих масти. Различити састав масних киселина у оквиру *high-fat diets* исхране може стимулисати или супримирати запаљење и развој тумора код експерименталних животиња. Засићене масне киселине средњег и дугог ланца, палмитинска, стеаринска и $\omega 6$ полинезасићене масне киселине, линолинска и арахидонска киселина имају проинфламаторни ефекат који промовише настанак и раст тумора, те њихов висок удео у исхрани повећава ризик од настанка рака дебелог црева. Насупрот томе, незасићене масне киселине, као што су олеинске и коњуговане линолне киселине и $\omega 3$ полинезасићене масне киселине, имају антиинфламаторна својства, те у том смислу делују као супресори канцерогенезе и смањују инциденцу и раст тумора

код експерименталних мишева предиспонираних на неоплазију (41, 42) Спроведена су истраживања заступљености $\omega 3$ и $\omega 6$ полинезасићених масних киселина у адипоцитима масног ткива нормално ухрањених и гојазних пацијената који који су оперисани од бенигну стања на дебелом цреву или колоректалног карцинома. Варијације у садржају $\omega 3$ полинезасићених масних киселина у адипоцитима обе групе испитаника су биле без статистичког значаја. Међутим, садржај $\omega 6$ полинезасићених масних киселина је био повећан како у адипоцитима гојазних пацијената уопште, тако и у адипоцитима код гојазних пацијената са раком дебелог црева у поређењу са садржајем $\omega 6$ полинезасићених масних киселина у ћелијама масног ткива гојазних пацијената који нису оболели од колоректалног карцинома. (43) Ови резултати, заједно са онима наведеним у претходном тексту, указују на реципрочну проинфламаторну и проонкогену везу између уноса масти одређеног састава и настанка карцинома дебелог црева. (44)

Истраживања спроведена од стране Светског фонда за истраживање рака (*World Cancer Research Fund*) и Америчког института за рак (*American Institute for Cancer Research*) указују на постојање убедљивих доказа да црвено месо и прерађено месо повећавају ризик за CRC-а (45). Добијена веза може се објаснити на више начина. Постоје докази да се припремањем меса на високој температури стварају хетероциклични амини који имају мутагени ефекат. У гастроинтестиналном тракту конзумирањем меса долази и до ендogene синтезе N-нитрозо једињења од којих су многа канцерогена. Месо садржи велике количине гвожђа у хемијском облику које у вишку утиче на развој рака колоректума. Нитрати и нитрити, који се додају месу, као конзерванси, могу повећати екзогену изложеност N-нитрозо једињењима и њиховим прекурсорима. Аскорбинска киселина и токоферол инхибишу ендогено формирање канцерогених N-нитрозо једињења. Повећан унос беланчевина може довести до ферментације аминокиселина у дебелом цреву и ослобађања канцерогеног амонијака. (46) У многим студијама уочена је повезаност између укупне количине конзумираног црвеног меса и месних прерађевина и ризика од рака колоректума. Последња истраживања показују да на сваких 100 грама/дан конзумираног црвеног меса и месних прерађевина ризик од рака колоректума расте за 14%, од рака колона за 25%, а од рака ректума за 31%. Ризик од колоректалног карцинома се повећава готово линеарно с повећаним уносом црвеног и обрађеног меса до количине од приближно 140 грама/дан. Изнад овог нивоа, повећање ризика је мање изражено. (47)

Поједине студије случајних узорака не показују да млеко и млечни производи смањују ризик од CRC-а, мада резултати 10 проспективних студија (534.536 случајева), указују на протективни ефекат ових животних намирница у случајевима када је њихова употреба већа од 250 грама дневно. Наведени резултати се односе само на колоректалне карциноме локализоване у дисталним деловима дебелог црева. (48) Конзумирање млека и млечних производа смањује ризик од рака колоректума. Претпоставља се да калцијум из ових намирница има протективну улогу. Он везује масне и жучне киселине, инхибира пролиферацију колоноцита, редукује цитотоксичност течног дела фецеса и спречава настајање тумора код експерименталних животиња. Испитивања су показала да суплементација калцијума у количини од 3 грама калцијум- карбоната дневно (1.200 милиграма елементалног калцијума) смањује ризик од рецидива колоректалних аденома (49). Постоје и опречни резултати, истраживања су у току.

Aune и сарадници су 2011. године публиковали преглед и мета- анализу великог броја дотадашњих проспективних студија у којима је током низа година истраживана повезаност између уноса хране богате дијететским влаканима и ризика од колоректалног карцинома. (50) Анализа је базирана на истраживањима Буркита из 1970. године у којима је изнето запажање о ниској учесталости рака дебелог црева код становника руралних области Африке, а који су у исхрани користили искључиво намирнице са високим садржајем биљних влакана. Анализом су обухваћени и резултати 13 великих северноамеричких и европских кохортних студија које су указале да уношење мање количине дијететских влакана (<10 грама/дан у односу на 10–15 грама/дан) повећава ризик од рака колоректума за 18% (51) Недавно су објављени слични резултати додатних кохортних студија којима је обухваћено више од 1,7 милиона учесника, што има довољну статистичку снагу да објасни повезаност између уноса хране богате дијететским влакнима и ризика од CRC-а (50). Заштитни ефекат дијететских влакана је вишеструк. Дијететска влакна повећавају волумен столице, разблажују концентрацију фекалних канцерогена и смањују време транзита фекалних маса кроз дебело црево, чиме се смањује контакт између карциногена и слузнице колоректума. (52) Поред тога, бактеријска ферментација биљних влакана резултује производњом масних киселина кратког ланца, које доказано имају антиинфламаторно и протективно дејство када је у питању колоректални карцином. Дијететска влакна су богата антиоксидансима, витаминима, минералима и фитоестрогенима. Имају висок садржај фолата и магнезијума, који су доказано повезани са смањеним ризиком од

колоректалног карцинома. Већи унос дијететских влакана такође штити од повећања телесне масе и дијабетеса типа 2, и могуће је да је део потенцијалног протективног дејства дијететских влакана управо посредован бољом контролом телесне масе и смањењем инсулинске резистенције. (50)

У многим до сада изведеним студијама уочено је да прекомерна телесна тежина и гојазност представљају факторе ризика за настанак рака колоректума. Најмање три велике кохортне студије су пронашле везу између гојазности и инциденце и морталитета од CRC-а. (53) Резултати испитивања показују да код особа оба пола старости између 35-54 године индекс телесне масе већи од 30 повећава ризик од CRC-а за 50%, и 2,4 пута га увећава међу особама оба пола старости преко 55 година живота. Прекомерне вредности индекса телесне масе код мушкараца имају већи статистички значај у случајевима CRC-а који се јављају у проксималном делу дебелог црева. (54) Анализе су показале да је тзв. абдоминална гојазност такође фактор ризика за рак колоректума, те да су индекси абдоминалне гојазности чак бољи предиктори ризика од CRC-а него укупна гојазност. Студије су показале да је обим струка већи од 99,1cm код жена, односно већи од 101,6cm код мушкараца, удружен са двоструко повећаним ризиком од рака дебелог црева. Овај ризик се повећава линеарно с повећањем обима струка и његово постојање је доказано за рак и проксималног и дисталног дела дебелог црева. (54)

Недовољна физичка активност је повезана с повећаним ризиком обољевања од CRC-а. Бројне студије су испитале овај однос. Већина указује да физичка активност смањује ризик од рака колоректума за просечних 40- 50% у оба пола. (55) Америчка асоцијација за рак и Центар за контролу и превенцију болести у циљу смањења ризика од обољевања у одраслих препоручују умерену физичку активност у трајању од најмање 150 минута недељно или 75 минута интензивне физичке активности седмично. (56) Физичка активност утиче и на редукцију телесне масе и смањење инсулинске резистенције.

Алкохол ремети синтезу DNK, доводи до стварања оксидативних радикала, инхибише репаративне ензиме (сва ова дејства остварује преко међупродукта ацеталдехида), а ремети и екскрецију и рециркулацију жучних киселина, као и нивоа естрогена. У алкохолним пићима могу да буду и други канцерогени агенси: кротон-алдеhid, нитрозамини и полициклични ароматични угљоводоници. (57) Мишљења по питању утицаја алкохола на настанак CRC су углавном усаглашена. Резултати

метаанализе осам кохортних студија показују да код особа које умерено конзумирају алкохолна пића (45 грама или око три стандардна пића дневно) постоји повећан ризик од рака колоректума у односу на особе које не пију алкохол. (58) Студије случајних узорака управо потврђују постојање умерено до јако позитивне везе између конзумирања алкохола и CRC-а, (58, 59) при чему нису утврђене разлике у дистрибуцији колоректалног карцинома по половима и сегментима дебелог црева. (60) Поједина истраживања указују на повезаност између уноса алкохола и појаве колоректалних аденома. Резултати испитивања спроведеног у Бургундији потврђују директну повезаност између тренутног уноса алкохола и величине аденома већих од 10mm, што сугерише да конзумирање алкохола може имати утицај на промотивну фазу секвенце аденом- карцином у случају колоректалних аденома већих од једног сантиметра. (61)

И поред опречних мишљења студије новијег датума показују да је пушење цигарета несумњиво један од фактора ризика за колоректални карцином. Резултати већине испитивања указују да пушачи имају повишен ризик од колоректалних аденома, те да је код пушача оба пола значајно повећан ризик од поновног јављања аденома колоректума након ендоскопске полипектомије. (62) Међутим, 28 година дуго клиничко праћење спроведено код 57.000 Финаца није показало повезаност између развоја CRC-а и пушачког статуса (бивши или активни пушач). (63) Тачније, није пронађена веза између пушења цигарета, чак и дуготрајног пушења, и поновног јављања аденома у делу популације која је праћена 4 године након иницијалне колоноскопије. (64) На другој страни резултати великих кохортних студија указују да утицај пушења на појаву CRC-а треба разматрати у временском периоду који није краћи од 35 година. Исти се сматра минималним индукционим интервалом за настајање CRC-а у популацији пушача. (65) Велика студија спроведена међу шведским близанцима показала је да активно пушење већег броја цигарета дневно у периоду од 35 година условљава троструко повећан ризик од развоја CRC-а, при чему су резултати анализе били статистички значајни првенствено за рак ректума, али не и за рак дебелог црева. (66) Коначно, *Botteri* и сарадници су на Европском Институту за Онкологију у Милану 2008. године спровели велику мета-анализу 106 опсервационих студија на тему "Пушење и колоректални карцином". Резултати 26 студија указују да особе које су пушачи или су икада пушиле цигарете имају повишен ризик од CRC-а у односу на особе које су одувек непушачи. Обједињена инциденца CRC-а у популацији бивших и

садашњих пушача (у поређењу са непушачима) износи 1,18 (интервал поузданости 95%), с апсолутним ризиком од 10,8 случајева на 100.000 особа годишње. У 17 кохортних студија анализирана је смртност бивших и садашњих пушача од CRC-а у односу на непушаче. Резултати указују да је пушење повезано са апсолутним повећањем ризика од смрти у 6,0 случајева на 100.000 особа годишње (интервал поузданости 95%). У оквиру ризика од CRC-а код пушача утврђен је и статистички значајан допринос дужине пушачког "стажа" и броја попушених цигарета дневно, тзв. ефекат "доза- реакција". Овај ефекат је био статистички значајан тек након 30 година пушења. Резултати ове велике мета- анализе су потврдили да су инциденца и морталитет од CRC-а код пушача статистички значајно већи првенствено за карцином ректума. (67)

Истраживања о ефектима аспирина у превенцији кардиоваскуларних болести показала су да употреба ацетилсалицилне киселине смањује учесталост CRC-а у случајевима када примена терапије није краћа од 10 година. (68, 69) Једна студија је доказала да терапија аспирином у дози од 100mg сваког другог дана у току 10 година, смањује учесталост CRC-а у испитаника за око 20%. (70) Значајан је податак да терапија аспирином код болесника оперисаних од CRC-а у првом стадијуму болести смањује број рецидива аденома, (71, 72) те да дугорочна терапија ацетилсалицилном киселином смањује морталитет од CRC-а кардиоваскуларних болесника код којих је примењиван због основне болести. (68)

Примена хормонских суплемената код жена у постменопаузалном периоду живота има доказани ефекат на смањење ризика од рака дебелог (48). За исто не постоји довољан ниво доказа када је у питању рак ректума. (73)

Резултати недавно ажурираног Кохрановог прегледа, који је обухватио 211.818 учесника, показују да примена антиоксиданата, у поређењу са плацебом, не утиче на инциденцу CRC-а. Слични резултати су добијени за различите антиоксиданте примењене било одвојено или комбиновано после периода 2-12 година: бета-каротен, витамин Е, селен, бета-каротен + витамин А, бета-каротен + витамин Е, бета-каротен + витамини С и Е + селен; бета-каротен + витамини С и Е. Исто су потврдили резултати недавне мета- анализе која је обухватила 11 кохортних студија и 702.647 учесника међу којима је испитан утицај каротена на ризик од CRC-а. (48)

1.2.2.2. Непроменљиви фактори ризика

Фактори који нису подложни превенцији попут узраста, пола, расне и етничке припадности, те личне анамнезе за полипозу и рак колоректума и инфламаторна обољења дебелог црева доказано повећавају ризик од CRC-а. (74)

Ризик се доказано повећава са годинама старости. Просечна старост пацијената у тренутку дијагностиковања болести је око 68 година код мушкараца и око 72 године код жена. За карцином ректума старосна граница је нешто нижа и износи 63 године живота у оба пола. Инциденца CRC-а је око 30% већа код мушкараца него код жена, док су стопе смртности веће приближно за 40%. Разлози за овакав диспарат по половима није у потпуности разјашњен, али до неке одражава разлике у изложености факторима ризика (нпр. пушење цигарета, конзумирање алкохола) и утицају полних хормона, као и комплексним интеракције између наведених фактора. (75) Разлози расних и етничких разлика у учесталости обољевања и смртности од CRC-а су сложени, и у великој мери одражавају разлике у социоекономском статусу. Резултати истраживања Америчке асоцијације за рак (*American Cancer Society*) показују да су стопе инциденце и смртности од CRC-а у популацији црнаца који живе у САД-у 20-50% веће у односу на популацију белаца и азијата. Истраживања су показала да особе с позитивном личном анамнезом за CRC-а чешће обољевају од рака дебелог црева или ректума, поготово уколико је иницијална дијагноза била постављена у млађој животној доби. (76) Наведено важи и када је у питању полипоза дебелог црева. Ризик од CRC-а је већи, нарочито у случајевима мултипле полипозе. (77) Особе које болују од инфламаторних болести црева имају готово двоструко већи ризик од CRC-а у односу на општу популацију. (78) Ризик се повећава са обимом, дужином трајања и тежином болести али се протоком времена смањује, вероватно због спровођења специфичних терапијских процедура и скрининга у циљу детектовања премалигних лезија. (79)

Колоректални карцином се у 70- 80% случајева јавља као спорадичан, у 30% случајева као фамилијаран, док је у око 5% случајева порекла наслеђене генетске абнормалности. (80, 81)

Сазнања о фамилијарном CRC-у су последњих година указала да већина CRC-а заступљених у породицама настаје због интеракције између начина живота и кумулативног ефекта релативно честих генетских варијација које повећавају ризик од обољевања (82) Особе чији првостепени сродници болују или су боловали од

колоректалног карцинома имају 2–3 пута већи ризик да оболе, и 3–6 пута већи ризик од обољевања ако је рак колоректума код првостепеног сродника дијагностикован у млађим годинама. (83) Ризик је највиши код особа код којих више првостепених сродника болује или је боловало од CRC-а. Ризик од фамилијарног CRC-а опада у случају позитивне породичне анамнезе за рођаке изван првог степена сродности. (84)

Наследни колоректални карцином представља 5% свих CRC-а. Јавља се у оквиру ретких наследних синдрома повезаних са генетским мутацијама које битно повећавају ризик од обољевања. (81) Најчешћи наследни синдром који значајно повећава ризик од CRC-а је је *Линчов синдром*, познат и као *хередитарни неполипозни карцином колона*. Наслеђује се аутозомно доминантно и резултат је мутације гена “*mismatch repair*”(MMR) система (hMSH2, hMLH1, hMSH6 и hPMS2) који је неопходан за одржавање геномске стабилности и исправљање грешака које настају у току репликације ДНК. У 90% случајева Линч синдром је последица мутације hMSH2 и hMLH1; у 10% мутације hMSH6, док се мутације hPMS2 ретко откривају. (85) Линчов синдром је узрок CRC-а у 2-4% случајева, међутим особе с овим наследним синдромом имају повећан ризик и за малигне болести других органа и органских система, укључујући ендометријум, јајник, танко црево и желудац. (86) Истраживања су показала да међу особама са Линч синдромом, 18% мушкараца и 19% жена развију CRC до 50 година старости, с респективним порастом оболелих на 45% и 54% у старосној доби до 70 година живота. (87) Колоректални карцином у оквиру овог синдрома је у 60% до 80% случајева лоциран у проксималним деловима дебелог црева, у поређењу са 30% у случају спорадичне форме CRC-а. Прекурсори CRC-а у оквиру овог синдрома су аденоми, при чему је секвенца аденом- карцином процењена на просечних 35 месеци у односу на 10- 15 година колико износи у случајевима спорадичног CRC-а. Колектомија је основни вид лечења болесника који у оквиру Линчовог синдрома развију рак дебелог црева или преканцерозне лезије који се не могу уклонити ендоскопски. Резултати неколико студија указују на високу учесталост метахроног CRC-а (16% за 10 година и 41% за 20 година) после сегментне ресекције дебелог црева. Кумулативни ризик у 10- годишњем периоду после парцијалне колектомије износи 16-19%, чак и код оних пацијената који су постоперативно били подвргнути редовном ендоскопском скринингу. Ризик од поновног развоја малигнитета је значајно мањи у случајевима када обим ресекције подразумева субтоталну или тоталну колектомију и износи 0-3,4%. (88)

Фамилијарна аденоматозна полипоза (FAP) је други најчешћи наследни синдром који значајно повећава ризик од CRC-а и узрок је око 1% свих карцинома дебелог црева. Код особа с овим синдромом се још у раној адолесценцији (10-12 година живота) развија више стотина до хиљада аденоматозних колоректалних полипа. (89) Код неправовремено дијагностикованих и неадекватно лечених постоји 100% ризик да до четрдесете године живота оболе од CRC-а, при чему се малигнитет развија 10 година након појаве полипа. Синдром је подједнако заступљен у оба пола и у општој популацији има учесталост од 1: 10.000 до 1: 30.000. *FAP* се наслеђује аутозомно доминантно услед мутације у APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) гену који се налази на хромозому 5q21. Тумор супресорски APC ген има централну улогу у *Wnt* сигналном путу регулисањем деградације β-катенина који је основни фактор пролиферације епителних ћелија црева. Мутација у APC гену доводи до губитка APC функције и резултује акумулацијом онкогеног β-катенина. Као узрок *FAP-a* описано је више од 1000 различитих мутација у APC гену. Већина оболелих има позитивну породичну историју ове болести, али у 25% случајева *FAP* се јавља као мутација APC гена *de novo*. (90) У 90% болесника полипи су присутни и у горњим партијама дигестивног тракта (желудац, дуоденум, дуоденална периампуларна регија...). Око 5% дуоденалних полипа у року од 10 година малигно алтерише и то је други узрок смрти пацијената који болују од *FAP-a*. (85) *FAP* се може клинички презентовати и екстраинтестиналним манифестацијама као што су коштани тумори, стоматолошке абнормалности, урођене хипертрофије пигментног епитела ретине, десмоидни тумори итд. Оболели имају повишен ризик и од малигнитета ван дигестивног тракта као што су папиларни и фоликуларни карцином штитасте жлезде, хепатобластом у деце и медулобластом. (90)

Атенуирани FAP (AFAP) је мање агресивна варијанта *FAP-a*, коју карактерише мањи број (10-100) аденоматозних полипа који се јављају у каснијој животној доби и имају мањи ризик од малигне алтерације. Полипи се углавном налазе у проксималном дебелом цреву и ретко у ректуму. (90)

Гарднеров синдром је аутосомна доминантна болест и подтип је фамилијарне аденоматозне полипозе (*FAP*). Карактеришу га аденоматозни цревни полипи и екстраколоничне манифестације болести у виду вишеструких коштаних тумора лобање, горње и доње вилице и бројних тумора коже и поткожног масног ткива. Интестинални полипи, ако се не лече, имају 100% шансе да постану малигни. (91)

Туркотов синдром је форма фамилијарне аденоматозне полипозе која је истовремено праћена повећаним ризиком од колоректалног карцинома и ризиком од малигнух тумора централног нервног система. Туркот и сарадници су 1959. године предложили три етиолошке форме болести. Прва је повезана с аутозомно доминантно наследном фамилијарном аденоматозном полипозом (мутација APC гена), друга са аутозомно доминантно наследним херeditарним неполипозним карциномом колона (мутација гена “*mismatch repair*” система), док се трећа форма наслеђује рецесивно. Тип тумора мозга који може настати у оквиру болести зависи од тога да ли је форма Туркотовог синдрома етиолошки сличнија *FAP*-у, када најчешће настају медулобластоми, док је глиобластом чешћи у етиолошкој форми која је ближа Линчевом синдрому. (92)

Синдром Peutz- Jaghers (PJS) и **јувенилни полипозни синдром- јувенилна полипоза (ЈПС)** су наследни синдроми карактеристични по гастроинтестиналним лезијама које се јављају у виду хамартомских полипа. Оба повећавају ризик од CRC-а али и од других малигнитета. У оквиру *PJS* полипи се најчешће јављају у танком цреву док у 25-30% случајева настају у желуцу и дебелом цреву. Болест почиње у раном детињству и клинички се манифестује опструкцијом танког црева, интусусцепцијом и крварењем из дигестивног тракта. Најизраженија екстраинтестинална манифестација синдрома је карактеристична хиперпигментација око природних отвора на телу (око усне шупљине, на букалној слузници и периорбитално). Ризик обољевања од малигнитета код особа с *PJS* је 81-93%. Ризик за карциноме гастроинтестиналног тракта износи око 70%, за карцином дојке 50%, и 11-36% за карцином панкреаса. За разлику од *PJS*, јувенилна полипоза обично нема екстраинтестиналне клиничке манифестације које олакшавају постављање дијагнозе. Основна карактеристика јувенилне полипозе су вишеструки јувенилни полипи заступљени најчешће у дебелом цреву али и у желуцу, дуоденуму и танком цреву. Особе које болују од овог синдрома имају ризик од CRC-а од оквирних 39%; код оних с мултиплим желучаним полипима ризик од карцинома желуца је приближно 21%, а могу се јавити и карциноми панкреаса. Предпоставља се да је *Peutz- Jaghers-ов* синдром повезан са мутацијом тумор супресорског гена *STK11 (serine threonine kinase 11)* који је познат и као *LKB1* ген и смештен је на хромозому 19p13. Мутација *STK11* гена је идентификована у чак 70% болесника с *PJS*. Синдром јувенилне полипозе је узрокован мутацијама у *SMAD4* или *VMPR1A* гену (доказанао у само 40% оболелих). (85)

Поред наведених постоје и други али мање заступљени наследни синдроми који доказано повећавају ризик од CRC-а (*Cowden-ов* синдром, наследни мешани полипозни синдром (HMPS), синдром хиперпластичне полипозе (HPS) итд.). Новија истраживања указују на потенцијално нове наследне синдроми који су у корелацији с повишеним ризиком од CRC-а. Неки од њих су *MAP* и *NAP* синдром.

MAP (MYH Associated Polyposis) синдром је редак ентитет, дефинисан и по први пут описан 2002. године. Оболели су подгрупа пацијената с клиничким *FAP-ом* или *AFAP-ом* али без вишегенерацијске породичне историје болести, и без детектабилне мутације APC гена. Узрок синдрома је аутозомно рецесивни поремећај у виду биалелне мутације MUTYH гена. Око 30% особа с *MAP* синдромом развиће полипе и у горњим партијама дигестивног тракта али без екстраинтестиналних манифестација. Студије су показале да особе с овим синдромом у 80% случајева обољевају од CRC-а у периоду између 40 и 60 година живота. (93)

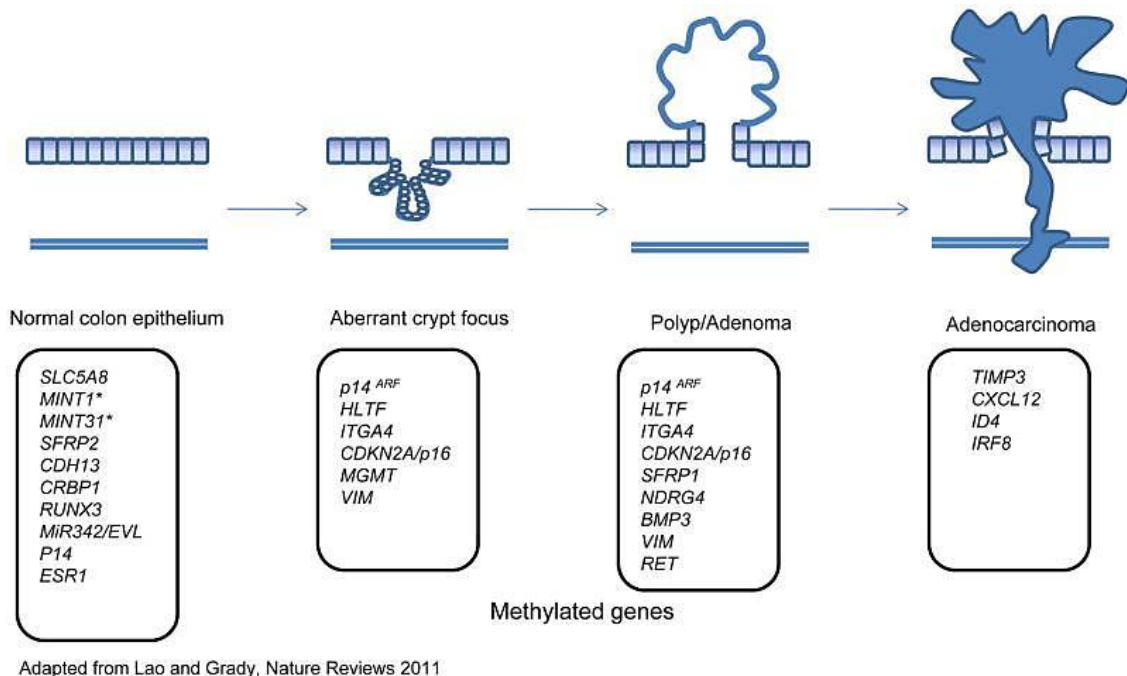
NAP (NTHL1-associated polyposis) је новооткривени полипозни синдром који се наслеђује аутозомно рецесивно и у чијој је основи хомозиготна мутација у NTHL1 гену. Резултати истраживања сугеришу да је синдром, поред CRC-а, у вези са широким спектром тумора (карцином ендометријума, дуоденума итд.). У току су додатна истраживања како би се дефинисао фенотип. (94)

1.2.3. Карциногенеза колоректалног карцинома

Процес трансформације нормалних ћелија у малигне захтева низ секвенцијалних мутација које настају као последица оштећења генома. Ова оштећења могу бити резултат ендогених процеса као што су грешке у репликацији ДНК, унутрашња хемијска нестабилност одређених ДНК база или услед дејства слободних радикала насталих током метаболизма. Оштећење ДНК може такође настати и услед интерреакције са егзогеним агенсима као што су јонизујуће, UV зрачење и хемијски канцерогени. Еволуција нормалне ћелије у малигну обухвата процесе помоћу којих гени укључени у нормалне хомеостатске механизме који контролишу пролиферацију и ћелијску смрт трпе мутацијска оштећења што резултује активирањем гена који стимулишу пролиферацију ћелија или њихову заштиту од ћелијске смрти, активирају онкогене и инактивирају гене који би нормално инхибирали пролиферацију ћелија тумора (тумор супресор гени). Малигна ћелија на тај начин превазилази нормалну контролу рађања и смрти и суочава се са два нова изазова: она мора превладати

репликативно старење и постати бесмртна, и мора осигурати адекватно снабдевање храњивим материјама и кисеоником како би задржала велику брзину пролиферације. (95)

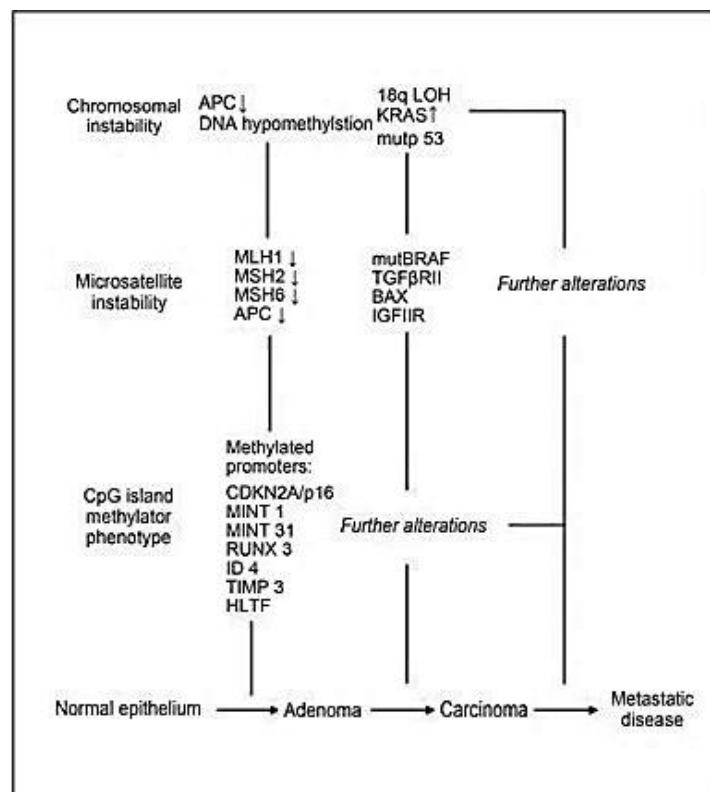
Колоректална карциногенеза је сложен процес и предмет је вишедеценијског истраживања. За разумевање фенотипског поремећаја у оквиру кога се јавља CRC, неопходно је познавање и разумевање специфичних механизма карциногенезе и основних генетских и епигенетских фактора који утичу на настанак болести. Један од централних аспеката у формирању колоректалног карцинома је акумулација стечених генетских и епигенетских промена које трансформишу нормалне жлездане ћелије епитела у инвазивне аденокарциноме. Класичан модел прогресије тумора предложен од стране *Fearon-a* и *Vogelstein-a* који је подразумевао иницијално стварање бенигну неоплазми (аденома и сесилних зупчастих полипа), праћен фазом њихове промоције у хистолошки напредније неоплазме, до коначне трансформације бенигну тумора у инвазивни карцином (Шема 1), до данас је претрпео бројне ревизије. (96)



Шема 1: Аберантно метиловани гени у полип → CRC секвенци; шематски приказ секвенце аденом- карцином у горњем делу слике (96)

Данашња сазнања указују да потенцијал за настанак инвазивних аденокарцинома имају не само тубуларни и тубуловилозни аденоми већ и зупчасти полипи, укључујући и сесилне зупчасте аденоме/ полипе и класичне зупчасте аденоме. Мутације гена и епигенетске алтерације (наследне промене у експресији гена или ћелијском фенотипу независне од промена у основној ДНК секвенци) доводе до инактивације тумор супресорских гена и последичне промоције неоплазми. Докази о генетским абнормалностима заједничким за спорадични и наследне форме CRC-а указују да проучавање фамилијарних синдрома као што су *FAP* и Линчов синдром, доприноси разумевању молекуларне патогенезе која се налази у основи спорадичне форме болести. (97)

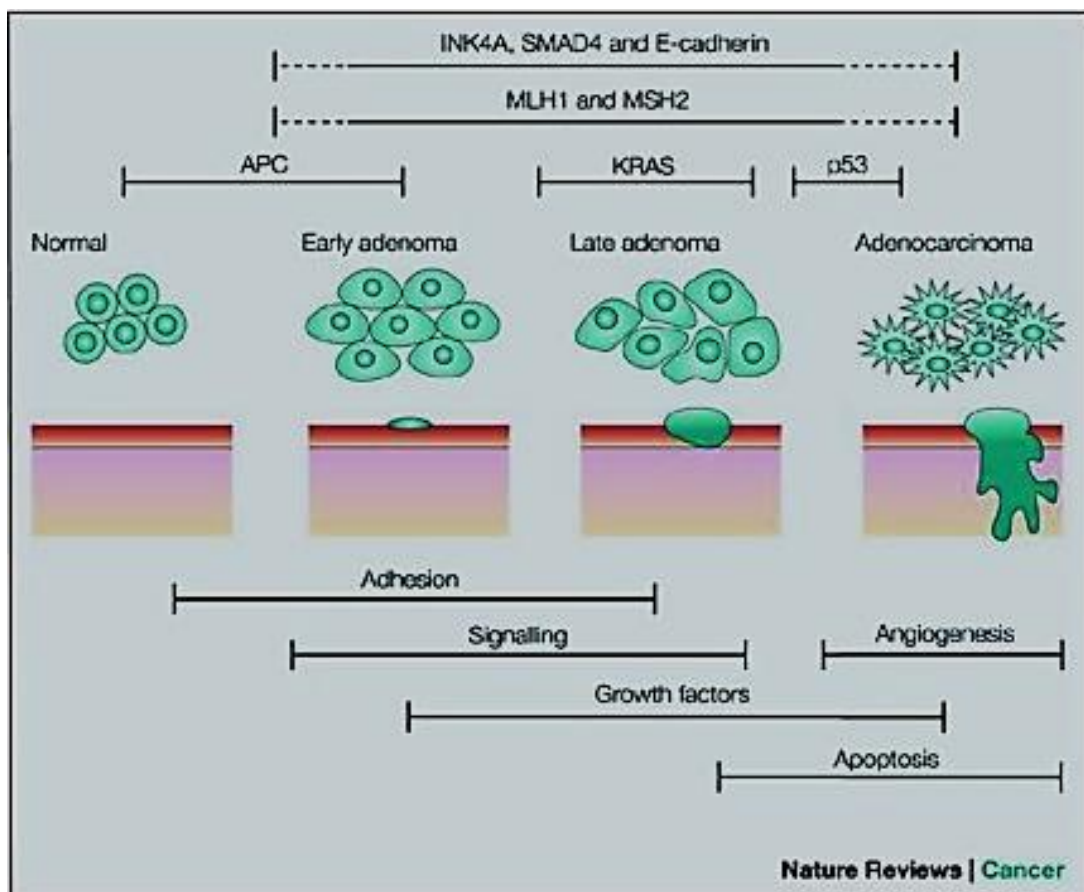
Најновија истраживања указују да CRC могу настати из једне или комбинације три различита механизма у чијој су основи: мутације у *APC* гену- феномен хромозомске нестабилности (CIN), мутација у генима за поправку погрешно упарене ДНК, тзв. микросателитна нестабилност (MSI) и хиперметилација генома (CIMP). (Шема 2.) Сваки од ових путева карциногенезе карактеришу специфичне особине, механизми и процеси туморског развоја. (98)



Шема 2. Молекуларне, генетске и епигенетске промене у односу на прогресију колоректалног карцинома (98)

Хромозомска нестабилност (CIN) је најчешћи облик геномске нестабилности и налази се у чак 85% свих CRC-а. Може се препознати присуством анеуплоидије или полиплоидије и дефинише се као присуство нумеричких или вишеструких структурних абериција хромозома. Упркос честој заступљености CIN-а код колоректалног карцинома, механизми који доводе до овог облика геномске нестабилности и улога анеуплоидије у прогресији тумора су и даље слабо разумљиви. Постоје докази да CIN промовише прогресију карцинома повећањем клонске разноликости, без обзира на основни узрок, и да се може јавити у раној фази полип- CRC секвенце. (96)

CIN позната и као секвенца аденом- карцином (Шема 3), настаје као последица активације прото- онкогена (KRAS) и инактивације најмање три гена за супресију тумора (APC на хромозому 5q21, p53 на хромозому 17p13 и губитак хетерозиготности хромозома 18q- 18qLOH). Недавно су описане мутације других гена (TGFBR и PIK3CA) укључених у модел секвенце аденом- карцином. (97)



Шема 3. Аденом- карцином секвенца. (97)

APC је најчешћи иницијално мутирани ген у фамилијарном/ наследном и спорадичном CRC-у. Спорно је да ли хромозомска нестабилност индукује секвенцу аденом- карцином или се она јавља током процеса карциногенезе и олакшава еволуцију CRC-а. (99) Тумор супресорски APC ген има важну улогу у *Wnt* сигналном путу регулисањем деградације β -катенина који је основни фактор пролиферације епителних ћелија црева. APC тумор супресорски ген нормално блокира транзицију из G1 у S фазу ћелијског циклуса. *Wnt* сигнални пут одржава матичне ћелије у криптама колона у недиференцираном стању, што доприноси не само преживљавању нормалних матичних ћелија, већ и преживљавању матичних ћелија карцинома. Током репликације и диференцијације у здравих особа недиферентоване ћелије епитела мигрирају из крипти колона и у току 3-7 дана подлежу процесу апоптозе. β -катенин контролише ово миграторно понашање. APC ген индукује деградацију β -катенина и стога функционише као негативни регулатор *Wnt* сигналног пута. (100) Мутација у APC гену доводи до губитка APC функције и резултује акумулацијом онкогеног β -катенина који се транслоцира у ћелијско једро и појачава транскрипцију различитих онкогена који покрећу пролиферацију ћелија. Акумулација недиферентованих ћелија у криптама колона на крају доводи до стварања полипа. Инактивација APC-а може настати услед *germline* и соматских мутација или услед хиперметилације његовог промотера. *Germline* мутације се чешће јављају у FAP-у, док су соматске мутације присутне у 72% спорадичних CRC-а, у 30-70% спорадичних аденома и 5% пренеопластичних лезија означених као аберантни криптални фокус (ACF). Инактивација APC-а услед хиперметилације се јавља код око 12% примарних карцинома и аденома. (98)

Као што је већ поменуто у моделу секвенце аденом- карцином, важну улогу у настанку CRC-а има и акумулација мутација других гена као што су KRAS и TP53.

KRAS онкогена мутација има значајну улогу у механизму настанка CRC-а. Резултати истраживања показују да је KRAS ген мутиран у око 30% колоректалних аденома и 30-50% колоректалних карцинома. (101) KRAS ген кодира мали 21-kDa протеин који се преко ћелијских рецептора транзиторно активира под утицајем екстрацелуларних стимулуса и сигнала као што су фактори раста, цитокини и хормони. (102) KRAS протеин модулира преношење екстрацелуларних стимулуса и сигнала између активiranог и инактивiranог стања, тако што катализује процес хидролизе гуанозин- трифосфата (GTP) у гуанозин- дифосфат (GDP). Мутирани ген RAS ремети функцију KRAS протеина што омогућава активно преношење митотских сигнала и

спречава апоптозу. Најчешће мутације KRAS гена код свих хуманих карцинома су G>A транзиција и G>T трансверзија. Резултати неколико студија указују да се KRAS мутације чешће јављају код добро и средње диферентованих форми CRC-а и код тумора лоцираних у дисталним деловима дебелог црева. Нека испитивања сугеришу да је KRAS мутација повезана са лошом прогнозом и узнапредовалом формом болести. Две мале студије са релативно детаљном морфолошком анализом колоректалног аденома и аденокарцинома сугеришу да је KRAS мутација повезана са дифузном пролиферацијом и смањеном апоптозом. Док већина студија KRAS мутацију описује код муцинозног колоректалног карцинома, 11 студија је пријавило мутацију KRAS-а у случајевима немучинозних карцинома, без обзира на статус микросателитне нестабилности (MSI). (101)

Ген TP53 је смештен на хромозому 17 и има значајну улогу у контроли ћелијског циклуса и апоптозе. Протеин p53 индукује заустављање ћелијског циклуса у G1 фази и олакшава репарацију DNK. Ако је репарација DNK неуспешна, p53 индукује ћелијску смрт (апоптоза). Међутим, p53 је у већине тумора дисфункционалан. Утврђено је да у појединим туморима постоји тзв. *gain-of-function* мутација TP53, што резултује настанком мутиране форме протеина, тзв. *mutp53 isoform*. Истраживања на експерименталним животињама су показала да ова изоформа, делује проинфламаторно и убрзава процесе који коначно резултују настанком инвазивног карцинома. (103) Губитак функције p53 се јавља код 44,9% колоректалних аденома и 42,22% појединачних и 43,75% мултиплих примарних CRC-а. (104) Бројне студије су покушале да испитају прогностички значај TP53 мутације у CRC-у, уз опречне резултате. Испитиван је прогностички значај прекомерне експресије гена TP53 код пацијената оболелих од CRC-а са позитивним нодалним статусом. Петогодишње преживљавање p53- позитивних пацијената било је скоро двоструко веће у односу на p53 негативну групу (60% у односу на 35%). Поједине студије су показале да прекомерна експресија p53 у III стадијуму болести корелира са бољим укупним преживљавањем пацијената са CRC-ом. Насупрот томе, резултати појединих истраживања о значају p53 статуса као маркера за укупно преживљавање пацијената у оквиру адјувантног третмана CRC-а нису показала постојање прогностичког значаја иако је у 60% оболелих постојао висок ниво експресије p53. (97)

Губитак хетерозиготности хромозома 18q (*18q Loss of Heterozygosity- LOH*) је такође један од узрока хромозомске нестабилности (CIN). LOH је дефинисан као

губитак једне од две копије или једног генског алела. Преостали алел утиче на мутацију. Ген DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) се налази на дугом краку хромозома 18 (18q21.3). Он кодира трансмембрански протеин DCC који је "условни тумор супресорски ген". Супротно обичним типовима трансмембранских рецептора, DCC блокира раст ћелија у одсуству свог лиганда, нетрин-1. Нетрин-1 се производи дубоко у криптама колоректалне слузнице. Како се епителне ћелије диференцирају и крећу ка површини, концентрација нетрина-1 се смањује. Овај градијент концентрације доприноси нормалним процесима апоптозе и обнављања епителних ћелија. Када је DCC ген мутиран, нетрин-1 се неће везати за DCC трансмембрански протеин, што доводи до абнормалног преживљавања ћелија. Приближно 70% CRC показује LOH у региону гена DCC. LOH у региону 18q21 и прекомерна експресија нетрин-1 је уочена и код узнапредовалог колоректалног карцинома. (97)

Микросателитна нестабилност (MSI) је детектована у око 15% свих колоректалних канрцинома, од тога у 3% је повезана са Линчовим синдромом, а осталих 12% су спорадични случајеви узроковани хиперметилацијом промотера MLH1 гена. Колоректални тумори са MSI се чешће јављају у проксималним деловима дебелог црева, карактерише их изражен перитуморски лимфоцитни инфилтрат, слабо су диферентовани и могу бити муцинозног или *signet ring* изгледа. (105). Механизми настанка MSI су релативно добро проучени и обично подразумевају мутације у генима *Mismatch Repair* (MMR) система одговорним за поправку погрешно упарене DNK, али може настати и путем аберантне DNK метилације или соматских мутација. (96) Особе с Линчовим синдромом скоро искључиво развијају MSI колоректални карциноми јер је узрок самог синдрома управо мутација гена MMR система (hMSH2, hMLH1, hMSH6 и hPMS2) који је неопходан за одржавање геномске стабилности и исправљање грешака које настају у току репликације DNK. Насупрот томе, код спорадичног MSI колоректалног карцинома најчешће се бележи губитак MMR активности услед хиперметилације MLH1 гена од стране аберантне DNK. (106) Новија истраживања указују да спорадични MSI колоректални карциноми порекла зупчастих аденома често носе мутације BRAFV600E, док исте нису присутне код карцинома насталих услед мутација у MMR систему (Линчов синдром). (107)

Соматске мутације у MMR систему и генима EPCAM, POLE и POLD1 такође су повезане са CRC. Студије новијег датума су показале присуство соматских мутација у најмање два од ових гена у скоро 70% тумора код пацијената оболелих од CRC-а. (108)

У другој студији, две стечене мутације у MLH1 и MSH2 су примећене код 52% (13/25) испитаника. (109)

Хиперметилација промотера MLH1 у MSI-Н спорадичном CRC-у пронађена је у 83-100% тумора. (98) Исти закључак се добија у 15% оболелих са Линчевим синдромом, што у неку руку отежава њихову диференцијацију од спорадичног колоректалног карцинома. (110)

Глобална хипометилација DNK и локализована хиперметилација промотера су уобичајени епигенетски фактори у процесу карциногенезе. Хиперметилација генома (CIMP) доводи до инактивације транскрипције гена који имају улогу туморских супресора. (111) Мутације BRAF гена су уочене у раној фази настанка CIMP тумора. BRAF V600E мутација је у корелацији са MLH1 хиперметилацијом и има учесталост од 20,3% у неклассификованим и 18,7% у спорадичним случајевима CRC-а. Друга студија је потврдила хиперметилацију MLH1 у 80% MSI-Н спорадичних CRC-а, са губитком експресије и без познате *germline* мутације у MMR систему. (98) Пронађено је укупно 759 хиперметилованих регија, при чему се 96% ових региона јавља у BRAF мутираним туморима. Од укупног броја хиперметилованих регија, 229 региона су локализовани у регионима промотера који побољшавају више различитих сигналних путева попут *Wnt* сигналног пута, регулације *bZip* транскрипције, PI3 киназе итд. Рана активација *Wnt* сигналног пута приписана је APC мутацијама у CIN туморима. Међутим, хиперметилација промотера *Wnt* антагониста доводи до активације *Wnt* сигналног пута у каснијим фазама. Хиперметилација се примећује у седам генских промотера у процесу транзиције од нормалног епитела до аденома, и у четири од ових седам гена у процесу трансформације од аденома до карцинома. (112)

CIN, MSI и CIMP се често преклапају у молекуларним подтипovima тумора, што може имати значајне прогностичке импликације. (113) У једној студији која је обухватила 509 пацијената оболелих од CRC-а, тумори су иницијално класификовани као MSI или MSS. Друга група је даље класификована као CIN-само, CIMP-само, CIN + CIMP и тројно негативи тумори. Као што се очекивало, у групи MSI тумора је забележена најмања учесталост APC и KRAS мутација, друга најнижа учесталост p53 мутација, а највиша BRAF V600E мутација. Насупрот томе, група CIN тумора је имала највећу учесталост p53 мутације, а најнижу за мутације BRAF V600E. (98)

Преживљавање пацијента оболелих од CRC-а недавно је повезано са специфичним молекуларним подтипovima тумора класификованим на основу MSI,

CIMP, BRAF-мутација и статуса KRAS-мутација. У групи пацијената с MSI-H туморима (типови 1 и 5) забележена је највиша стопа петогодишњег преживљавања (89,5% и 93,1%), а затим следи група болесника с MSI-L/ MSS туморима (тип 4- 82,5%), без CIMP или BRAF и KRAS мутација, и напосред група пацијената чији су тумори показивали KRAS мутације (тип 3- 72,4%). Пацијенти код којих су били заступљени тумори групе 2 (тумори са CIMP и BRAF мутацијама) имали су најнижу стопу Петогодишњег преживљавања (49,2%). (114) Класификација тумора заснована на врсти мутација које су присутне у његовом фенотипу има важан клинички значај у одређивању адекватних хемотерапијских процедура. Уобичајене комбинације 5-флуороурацила (5-FU) са иринотеканом или оксалиплатином, те циљана терапија васкуларним ендотелијалним фактором раста (VEGF) и инхибиторима епидермалног фактора раста (EGFR) који се од недавно користе, нису увек од користи све у зависности од молекуларног подтипа CRC-а. Примена инхибитора EGFR има ефекте само код тумора код којих нису присутне KRAS мутације. Третман може бити чак и штетан, поготову када се инхибитори епидермалног фактора раста користе у дублету с оксалиплатином. (115) Тумори код којих је потврђена BRAF V600E мутација су такође резистентни на терапију инхибиторима EGFR чак и у присуству *wild-type* KRAS- а. (116) Слично претходном, показало се да је присуство микросателитне нестабилности узрок лошег одговора на стандардну хемотерапију, првенствено 5-флуороурацила. (117)

1.2.4. Клиничка презентација колоректалног карцинома

1.2.4.1.Симптоматологија

Студије које се баве систематском анализом клиничких показатеља специфичних за колоректални карцином фокусиране су на постојање одређених клиничких манифестација чије присуство указује на већу вероватноћу да је болест заиста и присутна. Опсервиране клиничке манифестације су представљене као вредности позитивних показатеља (*positive predictive values*- PPVs) болести и приказане су у табели. (Табела 1). PPV је вероватноћа да је болест заиста присутна када је резултат теста позитиван. (118)

КЛИНИЧКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	СРЕДЊА PPV, %
Палпабилна маса у абдомену или ректуму	NA*
Ректално крварење удружено са губитком тежине	13.0 (4.7–23)
Хипохромна анемија	11.0 (7.7–41)
Ректално крварење помешано са столицом	11.0 (3.0–21)
Ректално крварење у одсуству перианалних симптома	10.8 (6.9–18)
Ректално крварење + измењене цревне навике	10.5 (9.2–27)
Тамно ректално крварење	9.7 (7.4–17)
Ректално крварење и проливи	9.0 (3.4–19)
Ректално крварење и старост ≥ 60 или ≥ 65 година	8.6 (4.6–20)
Ректално крварење и старост ≥ 70 или ≥ 75 година	7.9 (4.9–31)
Измењене цревне навике или проливи	7.5 (0.94–14)
Ректално крварење код мушкараца	7.5 (2.4–17)
Ректално крварење и старост ≥ 50 или ≥ 55 година	5.9 (4–11)
Ректално крварење (недефинисано)	5.3 (2.2–16)
Ректално крварење и бол у трбуху	5.1 (1.7–23)
Ректално крварење, прва епизода	5.0 (2.2–14)

NA- није доступно

PPV- вредности позитивних показатеља

*Средње вредности нису доступне; појединачне студије наводе PPV > 15%

Табела 1: Клиничке манифестације које указују на повећани ризик од колоректалног карцинома

Палпабилна маса у ректуму и/или палпабилна абдоминална маса су значајни показатељи болести. Поједине студије износе податак да палпабилна маса у ректалној ампули у 80%, а палпабилни тумор у абдомену у 41% случајева корелира са CRC-ом. (119)

Вредности хемоглобина мање од 100 g/L су позитивни показатељ болести у оба пола и посебно у групи особа старије животне доби, поготову код мушкараца старијих од 60 година. Студијски резултати указују на вредности PPV-а за CRC које су веће у преко 10% пацијената који болују од анемије. (118)

Ректално крварење је значајан предиктор за колоректални карцином. У неким случајевима то је и једини симптом и знак болести. Већина студија крварење из ректума широко класификује, а најниже вредности PPV-а су биле једнаке или веће од

5% (Табела 1). (118) Вредности PPV-а расту у случајевима када се ректално крварење јавља у старијој животној доби, поготову код старијих мушкараца. Резултати једне студије су показали да ректално крварење код особа старијих од 60 година готово утростручује сумњу на CRC. (120)

Измењене навике дефекације, сигнификантан губитак телесне масе и бол у стомаку су такође значајни предиктори за CRC. Бројне студије су испитивале ректално крварење у комбинацији с наведеним клиничким манифестацијама, (за сваку понаособ и за више клиничких манифестација удружених с крварењем из ректума). Резултати указују на значајно повећање PPV-а. (Табела 1). Једна студија указује да се вероватноћа за CRC готово удвостручује код особа које с клинички манифестним ректалним крварењем истовремено имају и измењене навике дефекације и сигнификантан губитак у телесној маси. (121)

Објективни приступ испитивању и анализи клиничких манифестација које указују на ниво вероватноће да је болест присутна помогао је у развоју препорука за симптоматске пацијенте који потенцијално болују од CRC-а. Међутим, поставља се питање поступања с особама код којих је болест асимптоматска. Позитиван резултат теста на окултно крварење из дигестивног тракта (*fecal occult blood test- FOBT*) је доказано показатељ повећаног ризика од CRC-а. Према студијским испитивањима, једнократно позитиван *FOBT* код асимптоматских пацијената подразумева вредности PPV-а од оквирних 5,4%, (122) те у таквим случајевима треба поступати исто као и код клинички манифестних стања. Из наведеног разлога све клиничке манифестације са предикторним вредностима једнаким или већим од PPV-а које имају асимптоматски пацијенти са позитивним *FOBT* резултатом (5,4%) се сматрају високо ризичним за CRC.

1.2.5. Дијагноза, дијагностичке процедуре и скрининг колоректалног карцинома

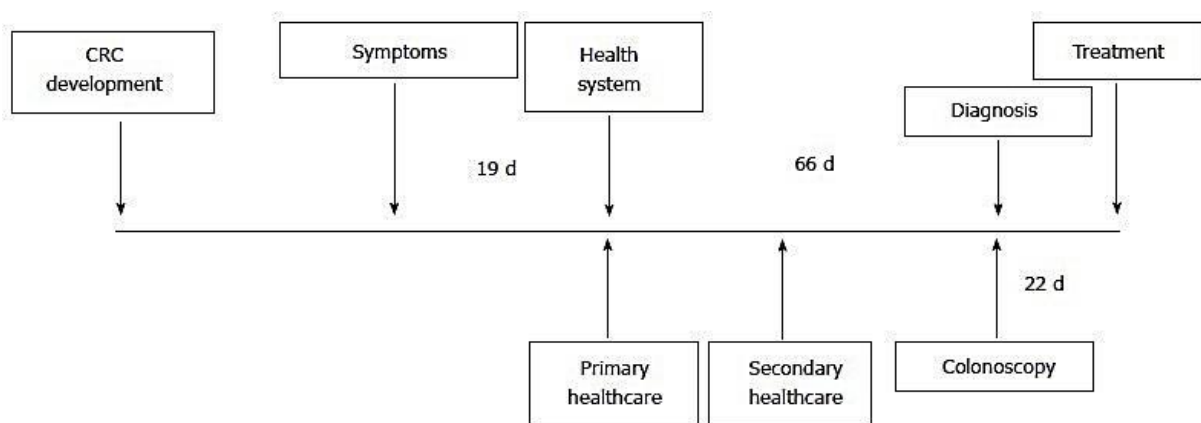
1.2.5.1. Клиничка дијагностика

Детаљна анамнеза, ректални туше, ригидна ректосигмоидоскопија и колоноскопија са биопсијом и хистопатолошком верификацијом тумора су процедуре које се обавезно морају спровести код пацијената у случају сумње на CRC. Међутим, дијагноза колоректалног карцинома и даље представља велики изазов у свим

здравственим системима. Често нема специфичних симптома и знакова болести, болна стања у абдомену су често последица не- неопластичних процеса, а не CRC-а, док се сама дијагноза углавном заснива на колоноскопији, инвазивној процедури, при чему су ресурси за извођење исте у већини случајева ограничени. Претходно наведени предиктивни модели за CRC се заснивају на процени симптома, а њихова дијагностичка тачност је ограничена. Дијагноза CRC-а је комплексан процес који укључује низ догађаја који се односе на пацијента, изабраног лекара и организацију и ресурсе здравственог система. Разумевање овог процеса је први корак у идентификовању фактора који се могу избећи у циљу смањења утицаја дијагностичког кашњења на прогнозу CRC-а. (123) Статистика је јасна. Петогодишње преживљавање пацијената са првим стадијумом колоректалног карцинома је око 90%, али само 13% код оних код којих је болест дијагностикована у тренутку када већ постоје удаљене метастазе. (124) Напредни здравствени системи широко примењују стратегије које за циљ имају побољшање прогнозе. Стратешке мере подразумевају програме за скрининг CRC-а код асимптоматских и процедуре које омогућавају рану дијагнозу болести код симптоматских пацијената. Скрининг тестови код асимптоматских пацијената доказано смањују стопу инциденце и морталит од CRC-а на два начина. Први је ендоскопско уклањање пренеопластичних лезија дебелог црева- ендоскопска полипектомија, а други подразумева дијагностиковање већег броја CRC-а у раној фази болести. (125)

Међутим, рана дијагноза CRC код симптоматских пацијената остаје проблем. То је сложен процес који почиње од тренутка када пацијент открије прве симптоме до тренутка када се болест потврди. Разлози за одлагање дефинитивне дијагнозе су мултифакторијални. (126) Неспецифичност симптома, касно препознавање или свесно занемаривање симптома болести од стране пацијента, кашњење због размишљања пацијента да ли и када да се обрати изабраном лекару, кашњење у заказивању прегледа, кашњење због протока времена између заказивања термина и реализације прегледа лекара опште праксе и кашњење до почетка лечења су фактори који несумњиво продужавају период до постављања дефинитивне дијагнозе. Пропусти лекара примарне здравствене заштите у смислу погрешне иницијалне дијагнозе, прописивања симптоматске терапије и/или приписивање симптома другим бенигним болестима, може значајно одложити постављање дијагнозе CRC-а. Студије показују да кашњење у дијагностиковању настаје и услед пропуста у оквиру физикалног прегледа пацијената, поготову оних који имају неспецифичну абдоминалну симптоматологију, и

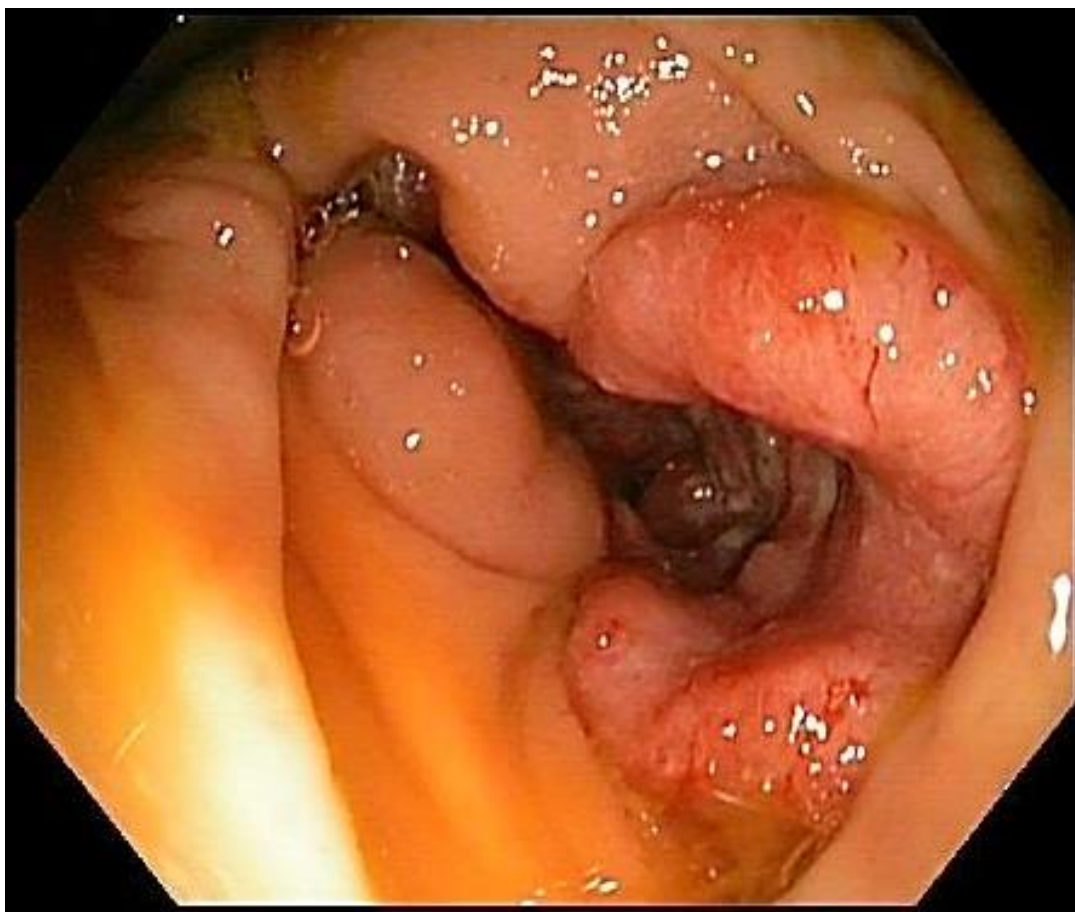
првенствено се огледа у неизвођењу дигиторекталног прегледа. Резултати недавних студија указују да је само 25% пацијената са ректалним карциномом дигиторектално прегледано приликом прве посете лекару примарне здравствене заштите, а лекари су обављали ову врсту физикалног прегледа само код једног од три пацијента. (127) Резултати истог истраживања указују да време између појаве симптома и дијагнозе CRC-а просечно траје 128 дана са широким временским интервалом између 57,5-257,5 дана (Шема 4).



Шема 4. Интервали одлагања у дијагнози колоректалног карцинома (у данима). (127)

Напредни здравствени системи су развили стратешке програме који треба да предупреду кашњење у постављању дијагнозе CRC-а код симптоматских пацијената. Процена симптома је свакако један од најважнијих разлога за извођење колоноскопије, и у 38,8% и 57,3% случајева је разлог свих индикација за ову врсту прегледа. (128)

Колоноскопија се сматра високоспецифичним, златним стандардом, за скрининг и дијагностику CRC-а. Процјењује се да је сензитивност колоноскопије у откривању карцинома и преканцерозних лезија већа од 95%. (124)



Слика 2. Аденокарцином колона- ендоскопски налаз. (извор: WEO Clinical Endoscopy Atlas; доступно на: <http://www.endoatlas.org>)

Колоноскопија је данас једна од најзаступљенијих медицинских дијагностичких процедура у свету. Само у САД-у годишње се уради преко 14 милиона колоноскопија. Колоноскопија омогућава директну визуализацију мукозе целог дебелог црева од орифицијума апендикса до доње денталне линије и истовремено узимање биопсија, као и дефинитивну терапију у виду полипектомије у случају преканцерозних лезија (полипа) или чак карцинома дебелог црева у најранијем стадијуму. Резултати многих студија указују да колоноскопија и ендоскопска полипектомија у великој мери смањују инциденцу CRC-а, а самим тим и морталитет. Међутим, протективни ефекти колоноскопије нису потврђени. За обезбеђење квалитета ове ендоскопске процедуре морају бити испуњени бројни услови (адекватна припрема пацијента, услови аналгоседације или краткотрајне интравенске анестезије за оне који не толеришу непријатност која се јавља у току прегледа, адекватана апаратура, искусан, обучен и високостручан кадар, адекватна документација за процену ризика, итд.) што је

пресудно за ефикасност прегледа и може смањити учесталост компликација које се могу јавити у оквиру процедуре (крварење, перфорација дебелог црева, кардиопулмоналне компликације итд.). (129) И поред чињенице да је колоноскопија високоспецифична процедура, ендоскопске полипектомије понекад нису ефикасне у ерадикацији полипа, што се сматра главним узроком појаве до 25% интервалних карцинома тј. карцинома откривених између две колоноскопије. (130) Коначно, колоноскопија не представља непогрешив “златни стандард”. Резултати појединих истраживања говоре да је проценат недетектованих великих аденома (већих од 10mm) између 6% и 12% док је проценат недетектованих карцинома око 5%. (131)

СТ колонографија (СТС), познатија као **виртуелна колоноскопија**, уведена је као алтернативна метода за дијагностику и скрининг колоректалног карцинома и представља алтернативу или комплементарну дијагностичку процедуру конвенционалној колоноскопији. Сматра се најбољом радиолошком процедуром за детекцију колоректалног карцинома (CRC) и полипа. Метода је једноставна за извођење и мање је инвазивна у односу на конвенционалну колоноскопију. Излагање зрачењу је минимизирано, а тумачење резултата је олакшано коришћењем алгоритама детекције помоћу рачунара. Сензитивност СТС-а у детектовању CRC-а и клинички значајних полипа ($\geq 10\text{mm}$) и код симптоматских и код асимптоматских пацијената је слична конвенционалној колоноскопији и супериорнија је у односу на иригиграфију с баријумским контрастом. (132) Резултати скорашње мета-анализе указују да сензитивност СТС-а за детектовање CRC-а износи високих 96%. (133) У студији која је обухватила 3.800 пацијената стопа недетектованих CRC-а је износила 5,3%, што је слично проценту "пропуштених" CRC-а код конвенционалне колоноскопије (5,9%) и значајно ниже него код иригографије с баријумским контрастом (6,7%). (132)

Индикације за извођење СТС-а су бројне. Непотпуна, неуспешна или из одређених разлога контраиндикована конвенционална колоноскопија, дијагностиковање симптоматских пацијената, поготову оних у одмаклој животној доби са значајним коморбидитетима и дивертикулоза дебелог црева су само неке од индикација. СТС се препоручује за скрининг CRC-а и за праћење након операције или полипектомије ако је класична колоноскопија неизводљива. Стања акутног абдомена, инфламаторне болести црева и праћење болесника с Линчовим синдромом су неке од контраиндикација за ову процедуру. (132)

Конвенционална колоноскопија у дијагностици CRC-а остаје златни дијагноистички стандард, док је виртуелна колоноскопија несумњиво важна алтернатива која показује сличне дијагностичке перформансе. Међутим, тачна локализација и величини тумора, степен инвазије зида органа, пропација тумора у мезентеријум, и присуство лимфних чворова и удаљених метастаза су неопходни критеријуми за планирање модалитета лечења CRC-а. (134) Класична радиографска дијагностика, компјутеризована томографија (СТ), магнетна резонанца (MRI), ендоскопски ултразвук (ERUS) и позитронска емисиона томографија (PET) имају значајну улогу у дијагностици карцинома колоне.

Класична *радиографија абдомена* је корисна као први корак у процени клиничког статуса пацијената који имају компликације CRC-а (опструкција и/или перфорација дебелог црева). Иригиграфија с двојним контрастом је један од модалитета за дијагностику и скрининг CRC-а али је сам поступак од малог значаја због високе стопе лажно позитивних резултата у детекцији полипа. (135)

Компјутеризована томографија- СТ (укључујући мултидетекторску компјутеризовану томографију- MDCT и СТ колонографију) се користи као додатна дијагностичка процедура за дијагностику и скрининг карцинома колоне, има значајну улогу у преоперативном стадирању болести и служи за процену тока болести у посттерапијском периоду као и за идентификовање рецидива и присуства удаљених метастаза. (136) Компјутеризованом томографијом се могу дијагностиковати тумори колоне и као узгредан налаз у оквиру СТ прегледа из других индикација, или се пак дијагноза тумора дебелог црева може поставити у оквиру СТ прегледа пацијената са акутним клиничким манифестацијама које су настале услед компликација CRC-а, као што је перфорација, на пример. (137) Тренутна улога СТ код пацијената са CRC-ом је контроверзна. Сензитивност у раној преоперативној дијагностици CRC-а, пре увођења MDCT-а, варира између 48% и 77%, (136) без могућности процене дубине инвазије зида црева. (138)

MDCT дијагностика високог квалитета омогућава значајно боље стадирање болести и има високу специфичност (93%) и високу сензитивност (86%) за детектовање степена инвазије тумора, и специфичност од 87% и сензитивност од 70% за детекцију метастаза у регионалним лимфним чворовима. Ограничења постоје и односе се на отежану идентификацију метастаза у лимфним чворовима код пацијената са N0 и N1 нодалним статусом. (139)

MRI и *ERUS* тренутно показују најбоље резултате у одређивању локалног стадијума болести код пацијената с карциномом ректума. *MRI* је супериорнија дијагностичка процедура за процену положаја примарног тумора, локалну екстензију и однос према мезоректалној фасцији, док је *ERUS*, са сензитивношћу до 97%, тренутно најегзактнији дијагностички модалитет за процену T1 туморског статуса. (140)

У 25% пацијената са раком дебелог црева и код 18% пацијената са раком ректума, метастазе су присутне већ у тренутку постављања дијагнозе. Најчешће коришћени модалитети за детекцију CRC метастаза су US, CT, MRI и PET/ CT. (141) Специфичност (95-96%) и сензитивност (74-86%) CT дијагностике у детектовању хепатичних метастаза је значајно већа у односу на US али је MRI суверена дијагностичка процедура у откривању CRC метастаза у јетри, поготову у процени метастатских лезија мањих од 1cm (специфичност прегледа је 93-97% и сензитивност 80-88%). (140) PET/CT показује високу сензитивност у детектовању метастаза у лимфним чворовима, међутим коришћење овог модалитета је ограничено и није индиковано у преоперативном стадирању болести код пацијената с CRC-ом код којих на CT-у није утврђено присуство хепатичних и/или метастаза у лимфним чворовима. (140)

За детекцију плућних метастаза, дијагностика се може ограничити на класичну радиографију. И поред чињенице да је CT сензитивнија метода, велики број детектованих лезија (4% -42%) није критеријум за постављање дефинитивне дијагнозе јер само једна четвртина пулмоналних лезија пронађених на CT-у су заиста метастазе CRC-а. Из наведеног разлога висок степен сензитивности CT-а не може бити оправдан за рутинско спровођење овог вида дијагностике. (142) Овај концепт подржава недавна студија која је показала да преоперативни CT плућа није оправдан код пацијената са CRC-ом код којих CT прегледом абдомена и мале карлице није утврђено постојање метастаза у јетри и лимфним чворовима, а код којих је иницијална радиографија плућа била негативна. (143)

Због високе специфичности и сензитивности, те позитивне предикторске вредности, одређивање вредности специфичних биомаркера има значајну улогу у процесу дијагностиковања и лечења CRC-а. Поједини биомаркери су бољи показатељи терапијских ефеката, ефикасности нео- адјувантне, хируршке, адјувантне хемотерапије и зрачне терапије, те праћења евентуалних рецидива болести, док су други специфичнији за скрининг CRC-а. Дефиниција биомаркера се углавном односи на

DNK, RNK, микроRNA, генетске и епигенетске промене или антитела. Међутим, поједини аутори дефинишу појам туморских маркера као синоним биомаркера, и означавају их као супстанце (најчешће протеине и гликолипиде) које представљају биолошке структуре чије праћење може указати на развој нормалних ћелија или процес карциногенезе у различитим фазама развоја тумора. (144)

Тестови за откривање туморске DNK у столици показују сензитивност за CRC у распону од 25- 92%, док нове технологије детекције имају специфичност и до 98%. (145) Одређивање DNK генетских и епигенетских биомаркера из крви према неким истраживањима има значајне предности, при чему је сензитивност ових тестова у распону од 30-87%, а специфичност износи око 96%. Одређивање RNK биомаркера у столици није наишло на широку примену због деградације микроRNK у фекалној средини. Међутим, поједини тестови показују значајну сензитивност (58%), при чему иста зависи од величине и локације тумора али не и стадијума болести. (144) Наспарм наведеног, резултати испитивања су показали да одређивање микроRNK у плазми има значајну дијагностичку важност код узнапредовалих CRC са респективном сензитивношћу (83%) и специфичношћу која износи око 84%. (146)

Ера употребе протеинских маркера за скрининг и рано дијагностиковање CRC-а започиње давне 1965. године, када је откривен карциноембрионални антиген (CEA), који је и данас једини туморски маркер признате ефикасности у праћењу терапијских ефеката код пацијената са CRC-ом. (147) CEA није специфичан само за CRC јер се повишене вредности овог маркера јављају и у оквиру неоплазми других органа (желудац, панкреас), као и у оквиру инфламаторних стања. Повећане концентрације CEA су ретко присутне у првом стадијуму болести, није специфичан за разлучивање природе колоректалних полипа и његове вредности се не препоручују за скрининг CRC-а. (148) Са прогностичке тачке гледишта, одређивање нивоа CEA је оправдано код пацијената са узнапредовалим CRC-ом пре него се подвргну хируршкој интервенцији. Након операције и ресекције R0, вредности CEA треба да се врате у нормалу у року од 4 до 6 недеља. Одржавање повишених вредности CEA може указати на инфилтративне лезије или метастазе. Споро повећање концентрације CEA након операције је типичан знак локалног рецидива болести, док прогресивни раст вредности може бити индикативан за развој метастаза, највероватније у јетри. (148) Одређивање вредности CEA свака 3 месеца у току прве три године после хируршке интервенције, а након тога

сваких 6 месеци у наредне 2-3 године, представља златни стандард за праћење терапијских ефеката у лечењу CRC-а (16)

Карциномски антиген 19-9 (CA19-9) је гликопротеин чија је релевантност у дијагностици CRC и даље проблем. Већина истраживача је дошла до закључка да је сензитивност CA19-9 много мања у односу на CEA-а, при чему је пораст вредности CA 19-9 лош прогностички знак. (149) Испитивањима су обухваћени и туморски маркери CA195, CA50, CA72-4, CA242 и CYFRA21-1, али са релативно незадовољавајућим резултатима због значајно мање специфичности и мање сензитивности у односу на CEA. Међутим, алгоритам заснован на комбинацији наведених маркера и CEA значајно побољшава њихов дијагностички значај у поређењу са сваким биомаркером понаособ. (150)

1.2.5.2. Хистопатолошки аспекти колоректалног карцинома

Хистопатолошка анализа тумора колоректума преоперативно (узорци добијени ендоскопском биопсијом) и дефинитивна хистопатолошка анализа ресекованих колоректалних карцинома је од изузетне важности за прогнозу болести и планирање модалитета лечења. Прецизна хистопатолошка верификација има све већу улогу у идентификацији наследних тумора и процени туморског одговора на специфичну врсту терапије. Хистопатолошка анализа ресекованих карцинома дебелог црева омогућава утврђивање хистолошког типа и хистолошког градуса тумора, патолошког стадијума болести, заступљености и броја метастазама захваћених лимфних чворова, указује на присуство васкуларне, перинеуралне инвазије и перитуморске лимфоцитне инфилтрације, омогућава хистопатолошку верификацију удаљених метастаза и извор је других значајних прогностичких и предиктивних фактора. (151)

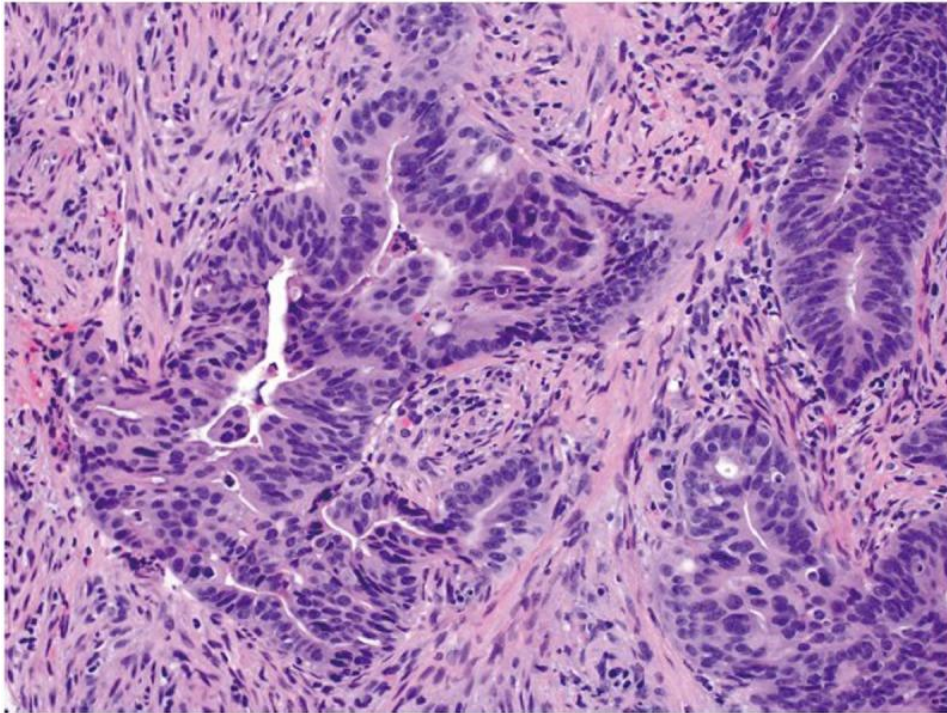
1.2.5.2.1. Хистопатолошки типови колоректалног карцинома

У класификацији Светске здравствене организације (редигована верзија из 2010. године), наведене су бројне хистопатолошке варијанте колоректалног карцинома. На основу хистолошких карактеристика карциноми су подељени у више група, при чему се као посебни ентитети издвајају група аденокарцинома, аденосквамозни карцином, вретенастоћелијски, сквамозни и недиферентовани колоректални карцином (Табела 2).

Аденокарцином
-Крибриформни комедо тип аденокарцинома
-Медуларни карцином
-Микропапиларни карцином
-Муцинозни аденокарцином
-Зупчасти аденокарцином
-Signet ring cell карцином
Аденосквामозни карцином
Вретенастоћелијски карцином
Сквामозни карцином
Недиферентовани карцином

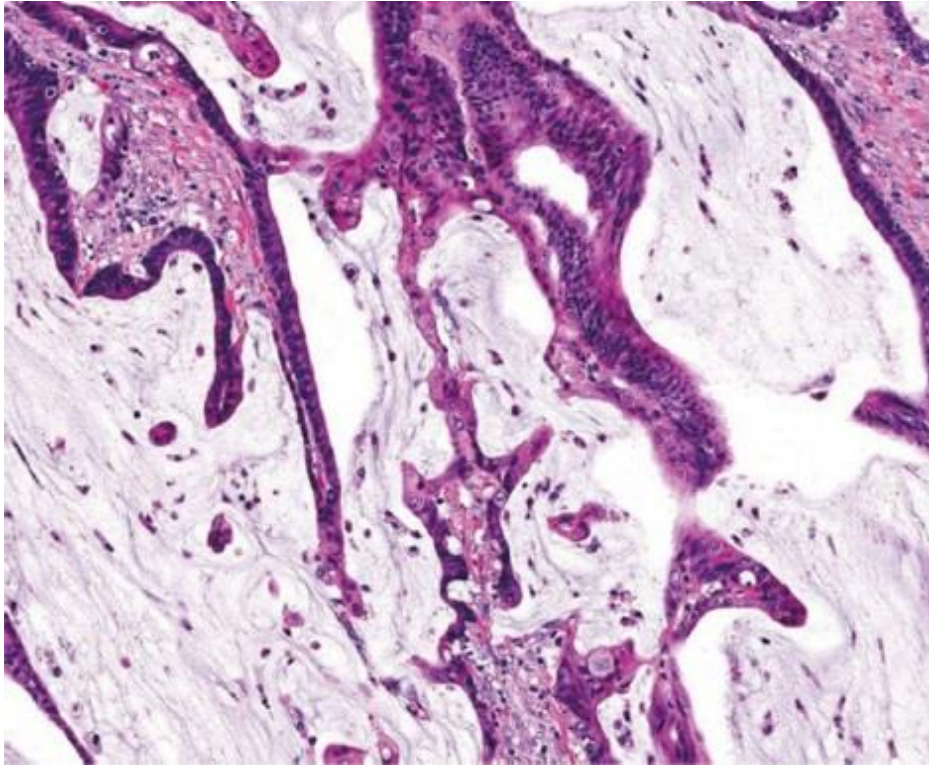
Табела 2. *Хистопатолошки типови колоректалног карцинома*

Више од 90% колоректалних карцинома су аденокарциноми пореклом из епителних ћелија колоректалне мукозе. Класични аденокарцином карактерише glandularна структура (Слика 3), међутим постоје форме специфичних хистолошких карактеристика. Посебно се издвајају муцинозни аденокарцином, аденокарцином са ћелијама печатног прстена и медуларни карцином.



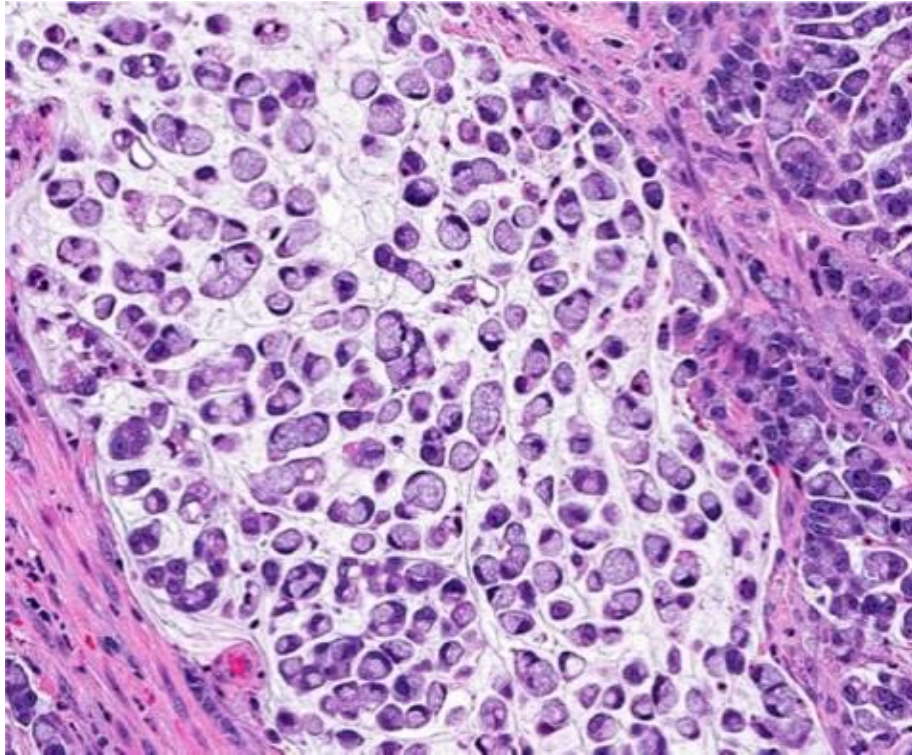
Слика 3. Пример умерено диферентованог аденокарцинома колона који показује компликоване glandуларне структуре у десмопластичној строми (оригинално увећање $\times 200$). (153)

Муцинозни аденокарцином је посебан тип колоректалног карцинома код кога више од 50% запремине тумора чини муциозна компонента. (Слика 4) (152) Код добро и средње диферентованих муцинозних карцинома муцин је смештен интрацелуларно, за разлику од слабо диферентованих форми где се налази у екстрацелуларном простору- у интерстицијуму, смештен око појединачних карциномских ћелија. Муциозна диференцијација колоректалних карцинома може бити присутна код спорадичног CRC који настаје на терену вилозних аденома, као и код карцинома у оквиру Линч синдрома. (152) Муцинозни колоректални аденокарцином у оквиру Линч синдрома је сврстани у тзв. *high-level MSI* туморе (153) и има бољу прогнозу у односу на микросателитно стабилне муцинозне аденокарциноме.



Слика 4. Муцинозни аденокарцином који показује обилно присуство екстрацелуларног муцина (оригинално увећање $\times 200$) (153)

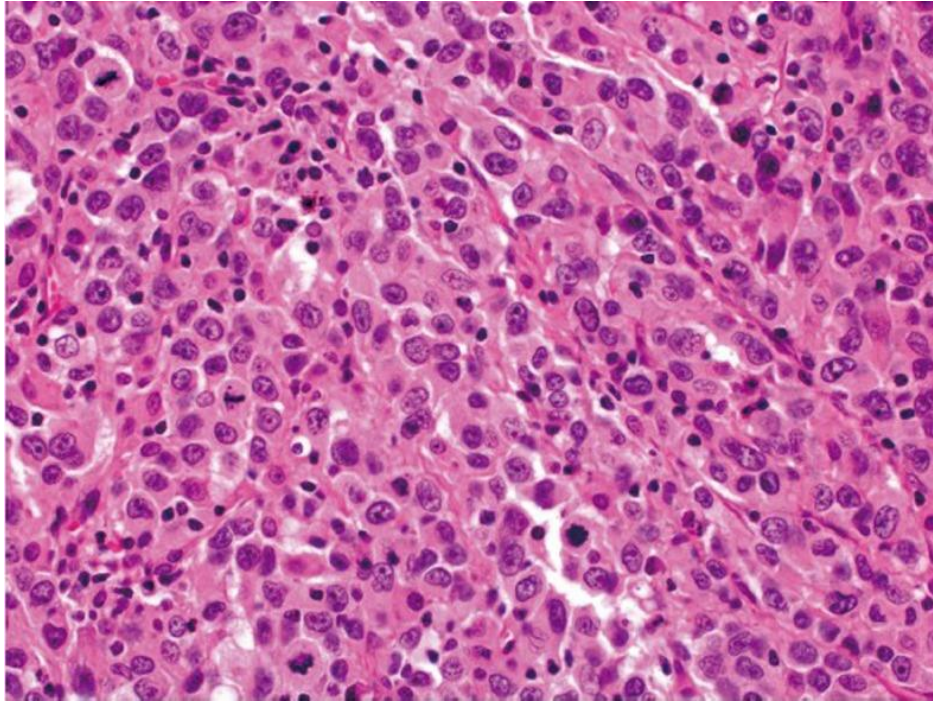
Колоректални аденокарцином са ћелијама печатног прстена (*Signet ring cell adenocarcinoma*) је ретка хистопатолошка форма и заступљен је у мање од 1% свих CRC. Слично као муцинозни карцином, карцином са ћелијама печатног прстена је дефинисан присуством више од 50% туморских ћелија које показују карактеристичне особине налик печатном прстену (велике интрацитоплазматске вакуоле испуњене муцином која потискује ћелијско једро ка периферији) (Слика 5). (153)



Слика 5. *Signet ring cell* аденокарцином колона (оригинално увећање x 400). (153)

Signet ring cell карцином се углавном јавља у спорадичној форми CRC као агресиван, инфилтришући тумор. По дефиницији је слабо диферентован и има лошију прогнозу од класичних аденокарцинома колоректума. Међутим, неки *signet ring cell* карциноми колоректума могу да буду из групе *high-level MSI* тумора, и стога се могу понашати као тумори ниске биолошке активности. (153)

Медуларни карцином је изузетно ретка хистопатолошка форма колоректалног аденокарцинома и јавља се у 5-8 случајева на 10.000 дијагностикованих CRC, са просечном годишњом инциденцом од 3,47 ($\pm 0,75$) на 10 милиона становника. (154) Ову форму аденикарцинома карактеришу епителиоидне неопластичне ћелије са великим везикуларним једрима, истакнутим нуклеолусима и богатом цитоплазмом. (Слика 6) Обично има повољну прогнозу упркос слабој диференцијацији или недиферентованим формама што се објашњава повезаности овог подтипа CRC аденокарцинома са групом *high-level MSI* тумора.



Слика 6. Слабо диферентовани медуларни карцином колона (оригинално увећање $\times 400$). (153)

1.2.5.2.2. Хистолошки градус

У употреби је више система за хистолошко градирање колоректалног карцинома. Већина стратификује туморе у три или четири групе на следећи начин:

Градус 1 (G1) - добро диферентован тумор

Градус 2 (G2) - умерено диферентован тумор

Градус 3 (G3) - слабо диферентован тумор

Градус 4 (G4) – недиферентован тумор

Основа за хистолошку диференцијацију је проценат заступљености glandуларних структура у односу на укупну запремину тумора. Добро диферентовани аденокарциноми (HG1) имају преобладајућу жлездану структуру која чини више од 95% запремине тумора. Код умерено диферентованих (HG2) овај проценат се креће између 50% и 95%, док су слабо диферентовани аденокарциноми (HG3) углавном

чврсте- солидне масе са мање од 50% жлезданих компоненти. Код недиферентованих аденокарцинома (HG4) glandуларна структура је непрепознатљива. (153)

Због незаобилазне субјективности патолога у процени хистолошког градуса тумора, као и због сличних хистолошких карактеристика добро и умерено диферентованих аденокарцинома, СЗО препоручује најновију верзију двостепене класификације на *Low grade*- добро диферентован колоректални карцином са 50 и више процената glandуларне грађе (раније добро и умерено диферентовани тумори) и *High grade*- слабо диферентовани колоректални карцином са мање од 50% жлезданих структура у стаставу тумора (раније слабо диферентовани и недиферентовани карциноми). (155)

Хистолошки градус тумора одређен према класификацији сугерисаној од стране СЗО има несумњиве предности али и даље постоје нека ограничења. Прво, критеријуми за одређивање хистолошког градуса хетерогених тумора се заснивају на процени најслабије диферентоване компонентне и не узимају у обзир величину саме неоплазме. Из наведеног разлога дефиниција слабе диферентованости се и даље заснива на прилично субјективној процени патолога. Поред тога, систем процене хистолошког градуса тумора коју промовише СЗО може се применити само на класичне аденокарциноме, али не и на његове хистолошке подтипове. (156) Слаба хистолошка диферентованост тумора се тренутно сматра главним нежељеним прогностичким фактором CRC, међутим истраживања новијег датума указују да одређивање хистолошког градуса тумора према препорукама СЗО има прогностички значај тек у корелацији хистолошког градуса са статусом микросателитне нестабилности (MSI). Постоје докази да *High grade* колоректални карциноми имају лошу прогнозу само ако су микросателитно стабилни, тј. понашају се као *Low grade* тумори ако показују висок степен микросателитне нестабилности тзв. *high-level MSI* тумори. Из наведених разлога, комбиновање хистолошког градуса са MSI статусом тумора се показало као прецизнији прогностички фактор. (157)

1.2.5.2.3. Патолошки стадијум болести

Колоректални карцином обухвата све малигне епителне туморе дебелог црева и ректума, од којих је најчешћи колоректални аденокарцином. Према класификацији СЗО

из 2010. године, тумори колоректума се означавају инвазивним карциномима тек када својим инфилтративним растом наруше интегритет ламине мускуларис мукозе. Тачније, свој малигни потенцијал испољавају тек инфилтрацијом лимфатицима богате субмукозе зида органа. Познавање механизма и путева ширења тумора (локални инвазивно-инфилтративни раст, лимфогена, периваскуларна и перинурална инвазија) је од примарне важности, јер помаже у дефинисању стратегије лечења, нарочито у погледу обима хируршке ресекције. (158)

Дијагноза CRC се поставља преоперативно, вишеструким ендоскопским биопсијама. После хируршког уклањања тумора и хистопатолошке верификације препарата (ресековани сегмент црева с тумором и припадајућим лимфним нодусима) одређује се степен малигнитета и патолошки стадијум болести (*staging*). *Dukes* је 1932. године први креирао систем за стадирање и процену патолошког стадијума болести. (159) У *Dukes-ову* групу А спадају тумори који инфилтришу мукозу и субмукозу без инвазије мишићног слоја зида црева, и без метастаза у регионалним лимфним чворовима. Тумори групе В по *Dukes-у* у потпуности инфилтришу зид црева, евентуално и периколично масно ткиво, али без метастаза у регионалним лимфним чворовима. У *Dukes-ову* групу С спадају тумори са метастазама у регионалним лимфним чворовима, а група D (уведена у класификацију 1967. године), означава присуство удаљених метастаза. Истраживања су показала да инфилтрација мишићног слоја зида црева има важан прогностички значај независан од статуса регионалних лимфних чворова. Пацијенти третирани хируршком ресекцијом у стадијуму А по *Dukes-у* имали су петогодишње преживљавање веће од 90%, и само 5% код болесника у стадијуму D. (160) И поред изузетне историјске вредности *Dukes-ова* класификација више није препоручљива.

Класификација *Astler- Coller-a* из 1954. године (161) је модификација *Dukes-ове* и доноси новине у смислу прецизнијег дефинисања дубине туморске инвазије зида црева. *Dukes-a* група В је подељена на В1 (тумор инфилтрише ламину мускуларис проприе али је не пробија) и В2 када тумор пробија мускуларис проприу. *Astler- Coller-ов* стадијум С1 дефинише патолошки статус у случајевима када тумор инфилтрише ламину мускуларис проприе, не пробија је, али су детектоване метастазе у регионалним лимфним чворовима. Стадијум С2 подразумева да тумор пробија мускуларис проприу уз метастазирање у регионалне лимфне чворове. (134)

Dukes-ова класификација патолошког стадијума болести и *Astler-Coller* класификација из 1954. године, модификована 1975. године приказане су у Табели 3.

опис	Dukes	Astler- Coller
Инфилтрација мукозе и субмукозе	A	A
Инфилтрација мускуларис проприе		B1
Инфилтрација читаве дебљине зида, евентуално параколичног масног ткива	B	B2
Инфилтрација перитонеума и околних органа		B3
Метастазе у 1-3 регионална лимфна нодуса	C	C1
Метастазе у 4 и више регионалних лимфних нодуса		C2
Метастазе у лимфне нодусе дуж магистралних крвних судова		C3
Удаљене метастазе	D	D

Табела 3. Класификација патолошког стадијума болести (*Dukes; Astler-Coller*)

Данас је у широкој примени TNM систем класификације дефинисан од стране Међународног удружења за контролу рака (*Union International cancer Control- UICC*) и Америчког комитета за рак (*American Joint Comitee on Cancer- AJCC*). Савремена TNM класификација је претрпела неколико ревизија и актуелна се заснива не само на хистопатолошкој анализи ресецираног сегмента црева с препаратом, већ и на резултатима преоперативних клиничких испитивања и пероперативном хируршком налазу. (162) Систем омогућава стадирање болести на основу карактеристика примарног тумора- Т (дубина инвазије зида црева, инвазија суседних структура у

односу на примарни тумор), статуса регионалних лимфних чворова- N, и присуства или одсуства удаљених метастаза- M.

Ознака "T" (плус одговарајуће слово или број) означава дубину инфилтрације зида црева од стране примарног тумора. Поједини нивои инвазије зида црева су подељене на мање групе како би се омогућио детаљнији опис тумора. (Табела 4.)

T_x: Величина примарног тумора не може се проценити.
T₀: Примарни тумор није нађен.
T_{is}: Карцином <i>in situ</i> (интраепителни и интрамукозални карцином, као и карцином са који инфилтрише али не пробија ламину мускуларис мукозе)
T₁: Тумор ураста у субмукозу, без инфилтрације ламине мускуларис проприе
T₂: Тумор инфилтрише ламину мускуларис проприу али је не пробија
T₃: Тумор пробија ламину мускуларис проприу и ураста у суберозу, или у околно периколично масно ткиво, али не у перитонеалну шупљину и друге органе
T_{4a}: Тумор пробија висцерални перитонеум
T_{4b}: Тумор ураста у околне органе или анатомске структуре.

Табела 4. "T" статус колоректалног карцинома

American Joint Comitee on Cancer- AJCC користи величину тумора за одређивање T туморског статуса и процену утицаја величине тумора на прогнозу болести. Међутим, величина тумора није укључена у *TNM staging* колоректалног карцинома, те су стога коришћени подаци из *National Cancer Data Base* ради процене да ли величина тумора корелира са *TNM* стадијумом болести и периодом преживљавања. Узорак је 300.386 пацијената с колоректалним карциномом код којих су на основу величине тумори сврстани у групе S1 (0 до 2cm), S2 (> 2 до 4cm), S3 (> 4 до 6cm) и S4 (> 6cm). Статистичка анализа је подразумевала корелацију величине тумора са *TNM* стадијумом болести, хистолошким градусом тумора и нодалним статусом. Анализа је показала да је величина тумора код оболелих од колоректалног карцинома обрнуто пропорционална

периоду преживљавања, те да је значајан прогностички фактор са негативним утицајем на прогнозу болести. (163)

"N" означава лимфонодуларни статус и описује да ли је примарни тумор метастазирао у регионалне лимфне чворове и који је број лимфних чворова захваћен метастазама. (Табела 5.) Квалитет *staging-a* колоректалног карцинома према препорукама *AJCC-a* обезбеђује анализа најмање 12 регионалних лимфних чворова. (164) Метастазе у регионалним лимфним чворовима су значајан прогностички фактор и један од кључних критеријума за доношење одлуке о модалитетима лечења, поготову када је у питању адјувантна хемотерапија. Код пацијената са негативним нодалним статусом забележена је стопа петогодишњег преживљавања од 70% -80%. Насупрот томе, петогодишње преживљавање оболелих од CRC с метастазама у регионалним лимфним чворовима износи 30% -60%. (165)

Nx: Присуство метастаза у регионалним лимфним чворовима се не може проценити
N₀: Нема метастаза у регионалним лимфним чворовима
N1a: Метастазе присутне у једном регионалном лимфном чвору
N1b: Метастазе присутне у 2- 3 регионална лимфна чвора
N1c: Сателитски туморски депозити у периколичном масном ткиву без метастаза у регионалним лимфним чворовима
N2a: Метастазе присутне у 4 до 6 регионална лимфна чвора
N2b: Метастазе у 7 или више регионалних лимфних чворова

Табела 5. "N" статус колоректалног карцинома

"M" у класификацији се односи на присуство удаљених метастаза. (Табела 6.) Упркос протоколима за превенцију и рано откривање CRC, метастатска болест је и

даље узрок великог броја смртних случајева оболелих од колоректално карцинома. Приближно 20% оболелих од CRC има метастазе већ у тренутку постављања дијагнозе. Велике студије креиране на основу резултата аутопсије преминулих од CRC дају увид у обрасце метастазирања колоректалног карцинома и указују да различити примарни тумори метастазирају на различитим местима, различитом учесталости. CRC најчешће метастазирају у јетру, плућа и перитонеум, али су описана и друга метастатска места, као што су кости, слезина, мозак и удаљени лимфни чворови, а изузетно панкреас и срце. (166)

M₀: Нема удаљених метастаза
M_{1a}: Метастазама захваћен један орган
M_{1b}: Метастазама захваћено више од једног органа перитонеалне шупљине
M_{1c}: Перитонеална дисеминација- карциноза

Табела 6. "M" статус колоректалног карцинома

Статистички подаци засновани на TNM систему класификације колоректалног карцинома указују на различите стопе петогодишњег преживљавања оболелих у зависности од стадијума болести. Стопа петогодишњег преживљавања оболелих у првом стадијуму болести износи 92% (за рак дебелог црева) и 87% (за рак ректума). Оболели са раком дебелог црева у стадијуму IIА имају стопу преживљавања од 87% (80% за рак ректума), а у стадијуму IIВ 63% (49% код оболелих од ректалног карцинома). Петогодишње преживљавање оболелих од карцинома колоне у стадијуму IIIА износи 89% (ректума 84%), у стадијуму IIIВ је 69% (ректума 71%), а у стадијуму IIIC 53%, односно 58% код оболелих од ректалног карцинома. Колоректални карциноми који су се проширили на друге органе често се теже терапијски третирају и имају лошију прогнозу. Метастатски, IV стадијум болести има 5-годишњу релативну стопу преживљавања од око 11% код оболелих од карцинома колоне и 12% код оболелих од рака ректума. (74)

Стадијум тумора одређен на основу Т, N и M категорије је означен римским бојевима од I (рани карцином) до IV (узнапредовала болест) са словном ознаком подстадијума (Табела 7). (164)

Stage	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
IIIC	T1-T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	било који T	било који N	M1a
IVB	било који T	било који N	M1b

Табела 7. TNM staging колоректалног карцинома

1.2.6. Лечење колоректалног карцинома

Успостављање стандарда за дијагнозу и лечење колоректалног карцинома је од изузетне важности за оптималну примену доступних стратегија у терапији оболелих. *European Society for Medical Oncology (ESMO)* је 2010. године у Лугану одржао мултидисциплинарну међународну консезусну конференцију ради одређивања

смерница и стандарда у клиничкој пракси у вези постављања дијагнозе и лечења колоректалног карцинома по стадијумима болести. Формиран је низ препорука које имају за циљ стратешки допринос тренутно најсавременијим приступима у третману оболелих. (16) Крајем 2014. године на међународном конгресу у Цириху постојеће смернице ESMO су ажуриране и данас су у широкој примени.

1.2.6.1. Хируршки третман

1.2.6.1.1. Хируршко лечење карцинома колона

Када је у питању лечење колоректалног карцинома препоруке сугеришу да се оптимална терапијска стратегија и адекватно изведена операција најбоље обављају у референтним здравственим центрима, од стране адекватно обученог мултидисциплинарног тима који чине хирург, радиолог, онколог и патолог.

Препоруке *ESMO* за хируршки третман карцинома колона подразумевају:

За рану фазу (стадијум 0) и I стадијум болести са туморским статусом T1 препоручује се ендоскопска- колоноскопска ексцизија (полипектомија), нарочито код пацијената са коморбидитетима. Ако хистопатолошка анализа докаже негативне линије ресекције, добру диферентованост тумора (G1, G2) и одсуство лимфне инвазије, препоручује се експектантан став јер је вероватноћа локалног рецидива мала, а метастазе у регионалним лимфним чворовима се могу јавити у свега 4% случајева. Позитивне линије ресекције, лоша хистолошка диферентованост тумора (G3, G4) и/или лимфна инвазија указују на велику вероватноћу локалног рецидива болести и метастазе у регионалним лимфним чворовима у 20% случајева. У оваквој ситуацији препоручује се класичан хируршки третман- хируршка ресекција. (129)

За ресектабилне карциноме колона, оптималан онколошки хируршки захват је куративна (R0) колектомија са адекватно позиционираним проксималним и дисталним линијама ресекције и *en-bloc* комплетно уклањање ресецираном сегменту припадајућег мезоколона са свим регионалним лимфним чворовима, тзв. комплетна мезоколична ексцизија (*Complete Mesocolic Excision – CME*). (168) С обзиром на чињеницу да у лимфну дренажу тумором захваћеног дела црева могу учествовати лимфни чворови на удаљености од око 8 сантиметара проксимално и дистално од самог тумора, препорука је да линије ресекције колона буду позициониране на најмање 10 сантиметара изнад и

испод супстрата, осим ако исто није ограничено локализацијом самог тумора и/или типом ресекције. (169) Централно лигирање крвних судова (*central vascular ligation, CVL*) који васкуларизују ресецирани сегмент црева је предуслов за комплетну мезоколичну ексцизију и уклањање највећег могућег броја регионалних лимфних чворова. (168)

За карциноме цекума и асцедентног дела колона, *CVL* подразумева лигатуру илеколичних крвних судова и десне гране средње количне артерије и вене. За туморе који се налазе у десној трећини попречног колона, препоручује се централна лигатура илеоколичних и средњих количних крвних судова. За туморе који се налазе у средњој и левој трећини попречног колона и проксималном делу десценса, *CVL* подразумева лигатуру средњих количних судова, усходне гране илеоколичне артерије и вене и усходне гране левих количних крвних судова. За туморе који се налазе на било којој локацији левог колона до ректосигмоидног прелаза, *CVL* подразумева лигатуру доње мезентеричне артерије на 1cm дистално до свог исходишта из аорте и доње мезентеричне вене тик испод доње ивице панкреаса. (168)

Ресекција се сматра непотпуном (R2) ако се не уклоне сви лимфни чворови који припадају ресецираном сегменту црева. За стадирање нодалног статуса тумора потребна је хистопатолошка анализа најмање 12 лимфних чворова. Ако су сви прегледани лимфни чворови негативни, али је број уклоњених мањи од 12, одређивање нодалног статуса није сигурно. Прецизност у стадирања карцинома колона управо корелира с бројем уклоњених лимфних чворова. Постоје три додатна разлога који потенцирају значај броја уклоњених лимфних чворова: 1) већи број уклоњених лимфних чворова повезан је са бољим преживљавањем, без обзира на статус нодуса; 2) однос метастатски измењених лимфних нодуса према укупном броју уклоњених лимфних чворова обрнуто пропорционално корелира с рецидивом болести и укупним преживљавањем; и 3) већи број негативних лимфних чворова корелира са бољим исходом чак и у III стадијуму болести. Последња два навода имају значај само када је број испитаних лимфних чворова већи од 12. (170)

Континуитет дигестивног тракта после учињене ресекције може се успоставити креирањем "ручне" или стаплерске анастомозе. До садашња испитивања показују да по питању компликација (попуштање анастомозе, стеноза анастомозе итд.) нема разлике између наведених начина реконструкције. Разлика није уочена ни у учесталости

компликација код анастомоза креираних у једном слоју у односу на двослојне технике. (171)

Специфичности попут постојања синхроних карцинома колона, компликације болести (крварење, опструкција, перфорација) и нересектабилни тумори у извесној мери захтевају измене у хируршкој тактици. Код синхроних карцинома колона сегментне ресекције црева са више анастомоза нису препоручљиве јер повећавају учесталост постоперативних компликација и укупни морбидитет. Ресекат мора да обухвати оба тумора, а континуитет дигестивног тракта треба успоставити креирањем једне анастомозе. Тумор колона који узрокује акутну цревну опструкцију хируршки се третирају тако да обим хируршке интервенције буде прилагођен пероперативном налази али може подразумевати и дефинитивну хируршку ресекцију са примарном анастомозом. Опције могу да подразумевају ресекцију са анастомозом или без ње (нпр. ресекцију по *Hartmann-у*), ресекцију дистендираног дела колона (субтотална/тотална ресекција колона) или постављање стента ради привременог решавања опструкције. У случајевима када су у питању нересектабилне лезије колона, препоручује се палијативно лечење код асимптоматских карцинома колона, односно палијативна хируршка процедура у случају компликација. Иста подразумева проксималну деривацију фекалног садржаја у форми колостоме. Ако опште стање пацијента дозвољава постоперативно се може спровести додатна терапија у виду хемотерапије и / или радиотерапије. (170)

1.2.6.1.2. Хируршко лечење карцинома ректума

Карциноми ректума су подељени у четири клиничке групе (с): врло рани (поједини сТ1), рани (сТ1-2, поједини сТ3), узнатредовали (сТ3, поједини сТ4) и локално узнатредовали (сТ4). Осим клиничког Т туморског стадијума, значајни фактори су: величина тумора, близина линије хируршке ресекције, клинички нодални стадијум, васкуларна и неурогена инвазија. Прецизно клиничко стадирање болести је неопходно да би се утврдила потреба за нео-адјувантном терапијом или одређеним обимом хируршке процедуре. Оптимална терапијска стратегија и адекватно изведена операција имају за циљ смањење морбидитета и морталитета, смањење учесталости локалних рецидива испод 10% и продужење укупног периода преживљавања изнад 70%. (16)

Преоперативни третман ректалних карцинома има за циљ да смањи ризик локалног релапса болести, да побољша ресектибилност и омогућити R0 ресекцију. Постоје два преоперативна терапијска приступа: локална радиотерапија и комбиновна хеморадиотерапија.

Код карцинома ректума, у зависности од стадијума болести, препоручено је неколико хируршких техника, уз напомену да би протективна илеостомија требало да буде стандард за све коло-ректалне или коло-аналне анастомозе.

Трансанална локална ексцизија се препоручује за T1, N0-х или T2, N0-х лезије након преоперативног нео-адјувантног третмана малих тумора ректума (мањих од 3cm), који захватају мање од 30% циркумференце лумена, по могућству локализованих бочно или постериорно и унутар 8cm од анокутане линије. Локална ексцизија треба да буде управна на зид ректума, да захвата пуну дебљину зида органа, укључујући околно периректално масно ткиво са линијама ресекције на удаљености од најмање 3mm од супстрата. Ако хистопатолошка анализа докаже позитивне линије ресекције, слабу туморску диферентованост, перинеуралну инвазију, инвазију екстрамуралних вена или лимфоваскуларну инвазију, индикувана је трансабдоминална радикална ресекција.

Предности трансаналне локалне инцизије су презервација сфинктера, минимални морбидитет и брз опоравак. Недостатак процедуре је немогућност процене локалног нодалног статуса и детекција евентуалних микрометастаза у лимфним чворовима које се јављају у 10% раних ректалних карцинома. (172)

Трансабдоминална ресекција ректума је стандардни третман у лечењу ректалног карцинома. Примјењује се велики број хируршких техника у зависности од локализације и хистолошких карактеристика тумора. Уобичајене процедуре подразумевају предњу високу ресекцију ректума, предњу ниску ресекцију ректума, ултраниску предњу ресекцију, интерсфинктеричну ресекцију ректума и различите врсте абдоминоперинеалне ресекције ректума. У сваком случају, хируршка ресекција треба да буде куративна (R0). Хируршки принципи радикалне трансабдоминалне ресекције ректалног карцинома подразумевају: 1) централно подвезивање и пресецање доње мезентеричне артерије, 2) подвезивање и пресецање доње мезентеричне вене тик испод доње ивице панкреаса; 3) мобилизација лиеналне флексура колоне ако је потребно; и 4) тотална мезоректална ексцизија. Тотална мезоректална ексцизија је стандард за све ресекционе процедуре на ректуму. Подразумева потпуно уклањање комплетне мезоректалне масти, укључујући све лимфне чворове. Извођење тоталне мезоректалне

ексцизије се препоручује код свих пацијената са карциномом ректума локализованим у средњој и доњој трећини органа. Делимична мезоректална ексцизија је прихватљива за рак ректума који је локализован у горњој трећини органа, на дистанци већој од 10-15cm од ано-кутаног прелаза, при чему линија ресекције ректума и месоректума мора бити на дистанци од 5cm испод тумора. (16)

Све ресекционе процедуре ректума подразумевају обавезну презервацију пелвичног нервног плексуса. Дистална линија ресекције се креира трансабдоминално или трансанално, а континуитет дигестивног тракта се успоставља креирањем колоаналне анастомозе, ручно или циркуларним стаплером. У случају преоперативног нео-адјувантног третмана, у зависности од врсте спроведене терапије, временски интервал до хируршке интервенције износи 1- 2 недеље (за кратке облике преоперативне радиотерапије), односно 6-12 недеља после дугог циклуса преоперативног нео-адјувантног третмана. (173)

1.2.6.1.3. Хируршко лечење локалних рецидива колоректалног карцинома

Локорецидивом се може означити обнављање болести у квадранту перитонеалног простора абдомена у коме је био смештен примарни тумор. Учесталост локорецидива у 5-огодишњем периоду после хируршког збрињавања износи око 11,5% за карциноме колона, док је увођењем преоперативне нео-адјувантне терапије и имплементацијом стандарда тоталне мезоректалне ексцизије и негативних линија ресекције, инциденца локорецидива оперисаних ректалних карцинома с 30% сведена на садашњих 10%. (174)

Код карцинома колона, већина рецидива се јавља у регији анастомозе. Према резултатима појединих студија локалном релапсу болести погодују услови хитног иницијалног оперативног збрињавања, карциномске перфорације или опструкције, техничке потешкоће и субоптималне примарне процедуре. Учесталост локорецидива после хирургије карцинома колона предиспонирају и високи Т и N стадијум тумора, положај примарног тумора на хепатичној флексури или сигмоидном колону, лоша диферентованост примарног тумора и неадекватна мезоколична ексцизија с малим бројем уклоњених лимфних чворова. Хируршко решавање локорецидива после хирургије карцинома колона у комбинацији са радиотерапијом и хемотерапијом могуће је у око 60% случајева. За остале случајеве резервисане су мере палијативног лечења.

Потенцијално куративна ресекција локорецидива се може постићи код приближно 20% оних који су кандидати за хируршку интервенцију. Петогодишње преживљавање оперисаних је око 40% али само за оне пацијенте код којих је спроведене комплетна ресекција локорецидива. У случајевима да хируршки третман рецидива није могуће или је непотпуно спроведен, ниједан пацијент не преживи 5 година. (170)

Предиктивни фактори за локорецидив ректалних карцинома су лоша хистолошка диферентованост тумора, постојање лимфне инвазије и неадекватна хируршка техника (непотпуна мезоректална ексцизија, непоштовање стандарда о негативним линијама ресекције и позицији дисталне ресекционе маргине). Локорецидиви после хируршког збрињавања ректалних карцинома могу бити централно- аксијални (анастомотични, мезоректални, перинеални), антериорни (са инфилтрацијом урогениталних органа мале карлице), постериорни (инфилтрација пресакралне фасције и коштаних структура мале карлице) и бочни с латералном пропагацијом болести. Анастомотични и антериорни рецидиви су погоднији за R0 ресекцију од осталих. (175)

У мање од 50% пацијената с локорецидивом ректалног карцинома може се спровести хируршка R0 ресекција као једини куративни третман. Хируршки тим неретко поред колоректалног хирурга чине и ортопед, уролог и специјалиста за пластичну хирургију. Апсолутне контраиндикације за ресекцију ректалних локорецидива су захваћеност илијачних крвних судова рецидивом болести, оток доњих екстремитета као последица венске или лимфатичне оклузије, као и лоше опште здравствено стање болесника. (176) Релативне контраиндикације за ресекцију су удаљене метастазе, примарно IV стадијум болести, екстензивни латерални клиренс рецидива и предвиђени хируршки R1 или R2 обим ресекције. (177)

Хируршко збрињавање рецидива ректалних карцинома је често мутилантна процедура с значајним раним постоперативним морбидитетом који се креће између 15% и 80%, и морталитетом који се креће и до 8%. Након ресекције R0, 5-годишња стопа преживљавања износи око 35%. Пацијенти након R0 ресекције живе дуже између 38 и 53 месеца у поређењу са онима код којих је хируршка процедура подразумевала R1 и R2 ниво ресекције. Како R2 ниво ресекције нема свеукупну корист у односу на палијативни третман ректалних локорецидива, исти треба избегавати. (178)

У случајевима да нео-адјувантна терапија није примењена пре прве операције, свакако је треба спровести пре покушаја ресекције локорецидива. Чак и ако је нео-

адјувантни третман спроведен у оквиру примарне хирургије, може се применити додатних 30-40 Gy. (173)

1.2.6.1.4. Хируршко лечење метастаза колоректалног карцинома

Олигометастаска болест (*Oligometastatic disease- OMD*) се дефинише као присуство метастаза колоректалног карцинома у виду лезија које се могу уклонити одговарајућим локалним процедурама (*local ablativ treatment- LAT*). Генерално, *OMD* подразумева постојање углавном висцералних и повремено лимфонодалних метастаза на две или три, повремено и на више локација. Типична места су јетра, плућа, перитонеум, лимфни чворови и јајници. Пацијенти са метастазама на другим местима, (вишеструки депозити у костима и мозгу, на пример) такође могу бити третирани коришћењем локалног аблативног приступа, при чему се због неповољне прогнозе у ових болесника локалне аблативне стратегије лечења користе само да би се спречиле тренутне компликације. Из наведеног разлога ови пацијенти су изузети из *OMD* класификације. С друге стране, пацијент са једном или двоструком метастазом у јетри и истовремено једном лезијом костију треба класификовати као да има *OMD*, јер се за пацијента са овим профилем болести могу користити локалне аблативне стратегије лечења и исте значајно доприносе бољој прогнози болести. Стратегија лечења пацијената са *OMD*-ом се заснива на могућности постизања потпуне ресекције свих туморских маса; примарног тумора, користећи хируршку R0 ресекцију са јасним ресекционим линијама и без доказа о микроскопском резидуалном тумору; и/или *LAT*-ом метастаза, било у оквиру примарне хирургије или након индукционог третмана системском терапијом. (179)

Код пацијената са *OMD* -ом која је ограничена на један орган (најчешће јетра) или неколико органа (најчешће висцералне метастазе, нпр. плућа), хируршко лечење је потенцијално куративно. Истраживања су показала су да у оваквим случајевима дугорочно преживљавање или чак излечење може бити постигнуто код 20% -50% оперисаних пацијената. За пацијенте који у оквиру *OMD* имају вишеструке метастаске лезије на различитим локацијама (примарни тумор, јетра, плућа, перитонеум, лимфни чворови, кости, мозак, јајник) и истовремену захваћеност више од 4 органа, резултати хируршког лечења су контроверзни. Код ових пацијената, операција може допринети дугорочном преживљавању, али је ретко куративна. (180)

За пацијенте са колоректалним хепатичним метастазама (*colorectal liver metastases -CLM*), индикована је ресекција секундарних депозита кад год је то могуће, узимајући у обзир прогностичке (онколошке) и техничке (хируршке) критеријуме приликом одабира кандидата за оперативно лечење. (181) Колоректалне хепатичне метастазе се сматрају технички ресектабилним уколико је могућа потпуна макроскопска ресекција уз презервацију најмање 30% здравог ткива јетре, тј. да однос масе остатка јетре у грамима и телесне тежине пацијента у килограмина буде већи од 0,5. (182) Међутим, и поред адекватне преоперативне процене и технички оптималне хируршке процедуре у 50% пацијената се после хируршке ресекције колоректалних хепатичних метастаза у року од 3 године после хируршке интервенције јавља системски дисеминована болест. (183)

Онколошки критеријуми указују на прогностичке факторе у смислу процене дужине преживљавања без болести (*disease-free survival- DFS*) или вероватноћу излечења. Критеријуми се базирају на броју метастатских лезија, присуству или сумњи на присуство екстрахепатичних метастаза и критеријуме засноване на бројним ретроспективним евалуацијама. У зависности од процене, за неке пацијенте неoadјувантна хемотерапија може бити боља опција него хируршка ресекција. (179) Прогноза пацијената са ограниченим плућним метастазама је слична онима са метастазама у јетри, са петогодишњом стопом преживљавања од 25% -35% након ресекције. (16)

Код добро селектованих пацијената са перитонеалним метастазама колоректалног карцинома, циторедуктивна хирургија и хипертермичка интраперитонеална хемотерапија (*hyperthermic intraperitoneal chemotherapy- HIPEC*) могу резултовати продуженим преживљавањем, под условом да се процедура спроведе у високоспецијализованим центрима, с обзиром на релативно висок морбидитет повезан с процедуром. (179) Ефикасност процедуре зависи од обима перитонеалне дисеминације болести који се процењује помоћу перитонеалног канцер индекса (*peritoneal cancer index- PCI*), који је главни прогностички фактор. Веома је важно да постоји адекватан избор пацијената (старост, коморбидитети, опште стање пацијента, врста малигнитета, да ли је раније примењивана радио и/или хемиотерапија). Опсег перитонектомије зависи од дистрибуције и проширености малигног процеса. Нормалан перитонеум не треба ресецирати, већ само површину која је захваћена малигним депозитима. (184)

1.2.6.2. Хемотерапија

Један од основних циљева антитуморске терапије је да се изазове процес програмиране ћелијске смрти малигно измењених ћелија. Већина хемотерапијских протокола се заснива на индукцији сигнала који могу да активирају унутрашњи митохондријални пут апоптозе. (185)

Апоптоза је еволутивно очуван механизам контроле ћелијског раста. Ћелијска смрт посредована апоптозом омогућава уклањање сувишних или оштећених ћелије из телесних ткива и битан је фактор ћелијске хомеостазе. Деградација ћелије током апоптозе је резултат разградње бројних ћелијских протеина дејством протеолитичког ензима *caspase (cystein aspartat proteinasa)*. (186) Екстерни пут активације овог ензима подразумева активацију прокаспазе-8 и прокаспазе-10, настаје тзв. *death inducing signalling complex (DISC)* и крајњи исход је, у зависности од типа ћелија, директна фрагментација једра и на крају ћелијска смрт, односно разлагање протеина *BH3* што доводи до активације унутрашњег, митохондријалног пута апоптозе. (187) Унутрашњи апоптотички пут је примарно индукован развојним аномалијама и различитим цитотоксичним догађајима који доводе до оштећења ДНК, као и дејством лекова или зрачења током лечења карцинома. Наведени процеси доводе до повећане пермеабилности митохондријалне мембране (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation- MOMP*) и ослобађања разних митохондријалних протеина, попут цитохрома *c*. (188) Ослобођени цитохром *c* као апоптотски фактор активације у присуству АТФ-а активира прокаспазу-9, а ова каспазу-3 и -7, што резултује каспазопосредованим протеолитичким реакцијама које доводе до ћелијске смрти. (189) Брзо и неповратно отпуштање цитохрома *c* из митохондрија је у животу ћелије генерално препознато као "тачка без повратка". Процес је чврсто контролисан, првенствено од стране тзв. *B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family* протеина. Група *Bcl-2* онкопротеина је подељена у више група, у зависности од њиховог про- или анти-апоптотског ефекта. Анти-апоптотички протеини, попут самог *Bcl-2* промовишу преживљавање ћелија инактивирањем њиховог проапоптота и очувањем интегритета спољашње митохондријалне мембране. Проапоптотички ефекторски протеини (*Bcl-2-associated-x protein (Bax)*, *Bcl-2 homologous agonist killer (Bak)*) једном активирани промовишу апоптозу формирањем "пора" на спољашњој мембрани митохондрија, док је проапоптотички ефекат тзв. *BH3-only proteins* од виталног значаја за иницијацију

митохондријског апоптотског пута, али *MOMP* захтева обавезно присуство било *Bax* или *Bak*. Малигне ћелије се убрзано умножавају и не подлежу процесима апоптозе првенствено услед смањене активности проапоптотичног протеина *Bax* и повећане цитоплазматске експресије антиапоптотичног протеина *Bcl-2*. (187) Међу свим до сада познатим *Bcl-2* хомологним доменима *BH3-only proteins*, *APR/PMAIP1/Noxa*, и поред слабог проапоптотског потенцијала, има пресудну улогу у детерминисању ћелијске смрти. Улога *Noxa* протеина је значајна за индукцију ћелијске смрти митохондријалним интритичним путем активације апоптозе. Иако не постоји потпуна корелација између експресије *Noxa* протеина и карциногенезе код човека, постоје докази да је активација овог протеина битна за ћелијски одговор на терапију (γ -зрачење; хемотерапија). Способност туморских ћелија да задрже или обнове и повећају експресију *Noxa* протеина је у директној корелацији с терапијским одговором на постојеће и нове протоколе лечења малигнух болести. (190)

Резултати претклиничких студија су показали да антитуморски лекови који инхибирају везивање *Bcl-2* на *Bax* и *Bak* индукују апоптозу широког дијапазона малигнух ћелија укључујући и ћелије колоректалног карцинома. (191)

1.2.6.2.1. Адјувантна хемотерапија колоректалног карцинома

Адјувантна хемотерапија је системско лечење након примарне ресекције тумора колоректума и има за циљ смањење ризика од рецидива болести и продужетак периода преживљавања оболелих. Адјувантном хемотеријом се циљају могуће резидуалне микрометастазе, при чему је оптимално време за започињање терапије најкасније 8 недеља после хируршке интервенције. (192)

Адјувантна хемотерапија је индикована код свих пацијената у III стадијуму болести, али и код високоризичних пацијената у стадијуму II. Високоризичним се сматрају они пацијенти у II стадијуму CRC код којих је доказано присуство најмање једног од следећих фактора: број уклоњених лимфних чворова мањи од 12, регистрована слаба диферентованост примарног тумора, присуство васкуларне, лимфатичне или перинеуралне инвазије, опструкција или туморска перфорације и патолошки туморски статус pT4. (164) Опциона адјувантна терапија за високо ризичне пацијенте са стадијумом II болести подразумева комбиновану терапију 5-FU и леуковорина са или без оксалиплатине или капецитабина.

Тренутни стандард за лечење болесника у III стадијуму болести је комбинована хемотерапија чија су окосница флуоропиримидин и оксалиплатина (FLOX- 5-FU, леуковорин, оксалиплатин или капецитабин; FOLFOX- оксалиплатин, леуковорин, 5-FU; XELOX- оксалиплатин и капецитабин; и комбинација леуковорина и 5-FU). Доказано је да је примена комбинованих хемотерапеутика по питању дужине преживљавања без болести (*disease-free survival- DFS*) и дужине укупног преживљавања (*overall survival- OS*) супериорнија у односу на ефекте појединачне терапије 5-FU-ом. (193) Резултати истраживања указују да адјувантна терапија само флуоропиримидинима у III стадијуму CRC-а смањује смртност за 10-15%, док је овај проценат за 4-5% већи уколико се 5-FU комбинује са оксалиплатином. (194) Из наведених разлога пацијенте у III стадијуму болести треба третирати адјувантном хемотерапијом са FU-ом и оксалиплатином у виду инфузионе (FOLFOX) или оралне администрације (XELOX) у комбинацији с претходним болусним FLOX режимом. (195) У случају клинички значајне неуротоксичности, оксалиплатин треба изоставити и FU наставити, пошто флуоропиримидин остварује око две трећине ефекта адјувантне FOLFOX/ XELOX терапије.

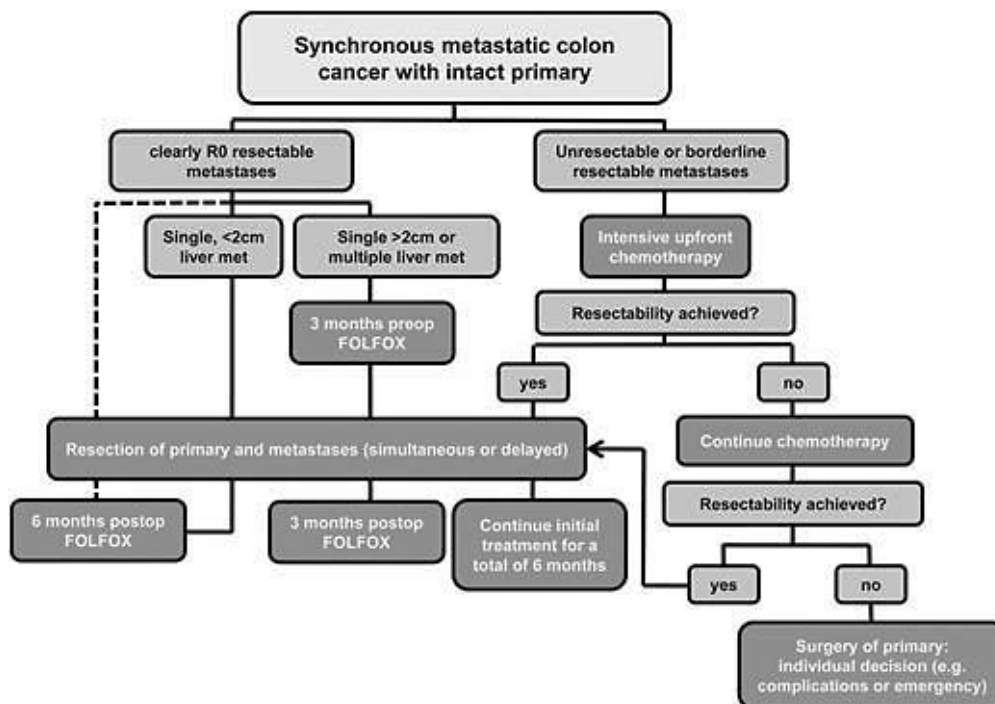
Протокол	Лек/дозирање/распоред	Бр. дана
Монотерапија		
Сареситабин	Сареситабин 1250 mg/m ² два пута дневно 1–15	22
5-FU LV	5-FU 400 mg/m ² i.v. болUS/ LV 200 mg/m ² i.v., затим 5-FU 600 mg/m ² i.v. 22 h-инфузија 1 + 2	15
Комбинована терапија		
XELOX	Сареситабин 1000 mg/m ² два пута дневно 1–15 дана, Oxaliplatin 130 mg/m ² 1 дан	22
mFOLFOX6	5-FU 400 mg/m ² i.v. болUS/LV 400 mg/m ² i.v.; затим 5-FU 2400 mg/m ² i.v. 46 h-инфузија, Oxaliplatin 85 mg/m ² 1 дан	15
FOLFOX4	5-FU 400 mg/m ² i.v. болUS/LV 200 mg/m ² i.v.; затим 5-FU 600 mg/m ² i.v. 22 h-инфузија 1 + 2, oxaliplatin 85 mg/m ² 1 дан	15

Табела 8. Препоручена адјувантна терапија за III/III стадијум колоректалног карцинома

Адјувантну хемотерапију треба започети што је раније могуће, почев од треће недеље, најкасније 8-12 недеља након операције. Ако је почетак лечења пролонгиран на више од 12 недеља, потребно је проценити бенефите од увођења терапије узимајући у обзир вероватно ограничену корист у односу на потенцијалне токсичне ефекте. (196) У случају лапароскопске операције адјувантну хемотерапију је могуће започети и раније. Тренутно важећи стандарди прописују администрацију лека у току 6 месеци. Ефекти и прихватљивост кратке, тромесечне адјувантне хемотерапије су још увек предмет разматрања од стране *International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy (IDEA)*. (197) Резултати истраживања о ефектима адјувантне хемотерапије код болесника старијих од 70 година у II и III стадијуму болести указују на мањи или никакав бенефит од примене хемотерапеутика са оксалиплатином, те третман старијих пацијената комбинацијом која садржи оксалиплатину треба узети с резервом. (198)

1.2.6.2.2. Хемотерапија колоректалног карцинома са синхроним метастазама

Стратегија лечења синхроног олигометастатског карцинома дебелог црева треба да се заснива на могућности постизања R0-ресеkcије, било на почетку или након индукционог третмана за системску болест и примарни тумор (Шема 5.).



Шема 5. Алгоритам лечења за синхрони метастатски рак дебелог црева. (16)

Код болесника који имају R0 ресектабилне хепатичне метастазе, без обзира на примарни тумор, према тренутно важећим стандардима преоперативно треба спровести хемотерапију у трајању од 3 месеца, након чега следи ресекција метастаза и тромесечна постоперативна адјувантна хемотерапија. Овакав приступ је доказан за примену FOLFOX протокола у групи пацијената који су имали до четири метастазе у јетри, без екстрахепатичне болести и без претходног третмана оксалиплатином. Код болесника који имају солитарну хепатичну метастазу мању од 2cm, пре ресекције депозита не треба спроводити хемотерапију. Иста је индикована постоперативно по FOLFOX протоколу. У случајевима када преоперативно није спроведена хемотерапија, после примарне R0 ресекције метастаза треба администрирати адјувантну хемотерапију са 5-FU и оксалиплатином у току 6 месеци, док је монотерапија 5-FU опција за пацијенте код којих постоје контраиндикације за примену оксалиплатине. (16) Постизање потпуног одговора у лечењу хепатичних метастаза преоперативном хемотерапијом је од великог прогностичког значаја, али се исто треба избећи како би се омогућила њихова ресекција пре потпуног нестанка. (199) Третман плућних метастаза CRC-а преоперативно треба прилагодити важећим стандардима за лечење болесника с хепатичним метастазама.

У случају иницијално нересектабилних метастаза преоперативно треба применити најактивнији неoadјувантни третман. Уколико метастазе постану ресектабилне следи операција примарног тумора и секундарних депозита и постоперативни наставак истог хемотерапијског режима у укупном трајању од 6 месеци (рачунајући и преоперативно спроведену терапију). У случају да метастазе остану нересектабилне и после спроведене терапије, третман треба наставити или променити у зависности од постигнутог терапијског одговора.

Код иноперабилних колоректалних карцинома треба применити што је могуће мање инвазиван приступ. Лечење треба усмерити на компликације које настају услед крварења из тумора и/или туморске опструкције дигестивног тракта. Чак и после спроведене системске хемотерапије терапија избора за оваква стања су палијативне хируршке процедуре, стентовање, ласерска аблација и слично. Профилактичка ресекција асимтоматског примарног тумора у случају иноперабилне системске болести је и даље контраверзна. Хируршки третман код симптоматских стања (стентовање, проксимална фекална диверзија или ресекција) може бити индикован али системска

хемотерапија углавном има само ефекте ублажавања или уклањања локалних симптома узрокованих примарним тумором. (200)

1.2.6.2.3. Новине у хемотерапији колоректалног карцинома

Адјувантна хемотерапија базирана на флуороурацилу у комбинацији с лековима који испољавају цитотоксично дејство, оксалиплатином на првом месту, уведена је у протокол лечења узнапредовалог карцинома колоне пре скоро две деценије. (201) Оксалиплатина је трећа генерација лекова на бази платине. Механизам дејства лека се приписује цитотоксичном дејству на малигне ћелије (оштећење и заустављање синтезе DNA, инхибиција синтезе RNA, активирање појединих имунолошких реакција) што доводи до апоптозе ћелија рака. (17) Упркос чињеници да је клиничка примена оксалиплатине повећала преживљавање оболелих од узнапредовалог карцинома дебелог црева, у 40% случајева долази до развоја терапијске резистенције. (18) Сензорна неуропатија услед кумулативне неуротоксичности и друга нежељена дејства оксалиплатине (19) и развој резистенције на лек су условили развој нових терапијских стратегија у лечењу колоректалног карцинома. Резултат тога су стална истраживања у циљу открића *non-platinum* лекова на бази метала који имају шири спектар дејства уз мање нежељених ефеката. (20) Водеће место међу њима, тренутно, заузимају комплекси рутенијума.

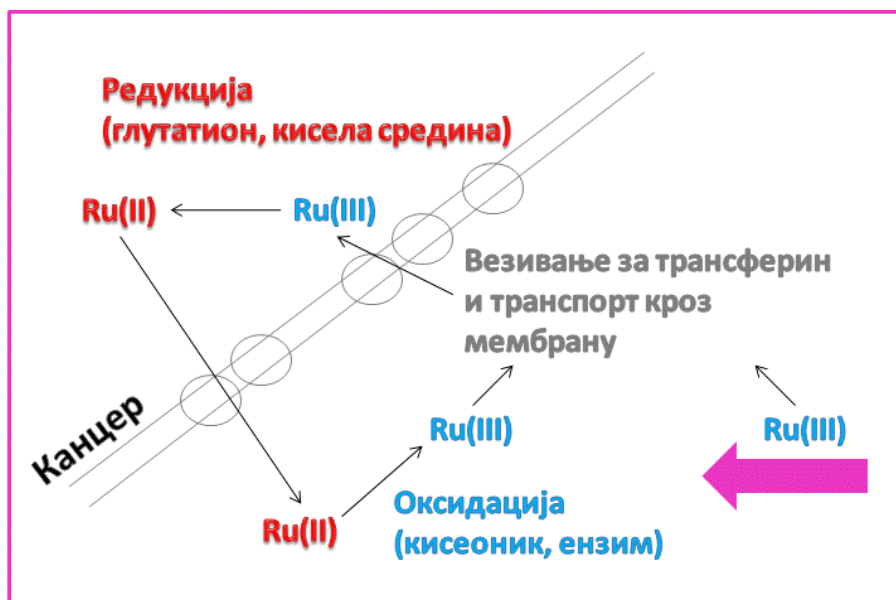
1.3. Рутенијум

Рутенијум спада у VIII групу прелазних метала и заједно са Os, Rh, Ir, Pd и Pt чини платинску групу метала. Име је добио по латинском називу за Русију (Ruthenia). Рутенијум има атомски број 44 ($Kr\ 5s^14d^7$) и атомску масу 101,07. Постоји неколико изотопа рутенијума (^{96}Ru , ^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru и ^{104}Ru) од којих је изотоп ^{102}Ru најзаступљенији са 31,6%. Рутенијум има широк опсег оксидационих стања од -2 до +8 тако да су његови комплекси редукционо активни и њихова примена као редукционих агенаса у различитим хемијским реакцијама је од великог значаја. У физиолошким условима може постојати у три оксидациона стања: рутенијум(II), рутенијум(III) и рутенијум(IV). Рутенијум(III) је доминантно оксидационо стање у физиолошким условима док су рутенијум(II) и рутенијум(IV) оксидациона стања која се лако постижу

у присуству биолошких редуктаната (аскорбинска киселина или глутатион) или оксидационих агенаса (O_2 или H_2O_2). Сва три оксидациона стања граде координациона једињења октаедарске геометрије, док рутенијум(II) органометални комплекси граде једињења псеудооктаедарске геометрије (тзв. „piano stool” комплекси). (202)

Рутенијум(II) има попуњене све три (t_{2g}) d орбитале што га чини дијамагнетичним док рутенијум(III) има један неспарен електрон у (t_{2g}) d орбитали и он је парамагнетичан. (203) Разлика у само једном електрону између ова два оксидациона стања значајно утиче на њихове хемијске карактеристике. Рутенијум(II) се понаша као мека киселина и може имати π -донорске особине, (204) а рутенијум(III) се понаша као тврда киселина и може имати π -акцепторске особине. (205)

Комплекси рутенијума(III) су инертнији у односу на одговарајуће комплексе рутенијума(II). Из тог разлога активациони механизам тзв. „активација редукцијом” предложен је од стране професора *Clarke-a*, који је био међу првима који су истраживали комплексе рутенијума као потенцијалне антитуморске агенсе. (206) Он је заједно са својим сарадницима предложио да комплекси рутенијума(III) прво подлежу *in vivo* редукцији до мање инертног рутенијум(II) оксидационог стања, а затим долази до отпуштања хлоридо лиганда и стварања аква метаболита који је способан да се веже за биолошке мете. (207) Ови комплекси остају у релативно неактивном рутенијум(III) оксидационом стању све док не стигну до туморског ткива где је присутан нижи сарджај кисеоника и рН, и повећана концентрација глутатиона (редукциони агенс) у односу на нормална ткива (Шема 6). У овим условима олакшана је редукција рутенијума(III) до рутенијума(II). Редокс потенцијал рутенијума је реверзибилан, па постоји могућност да се активан комплекс рутенијума(II) у нормално прокрвљеним ткивима са већом концентрацијом кисеоника, оксидује до инертног комплекса рутенијума(III). (208) Овај активациони пут може бити одговоран за селективну токсичност према канцерогеним ћелијама, као и за ефикасност према хипоксичним туморима који могу бити отпорни на хемотерапију и радиотерапију.



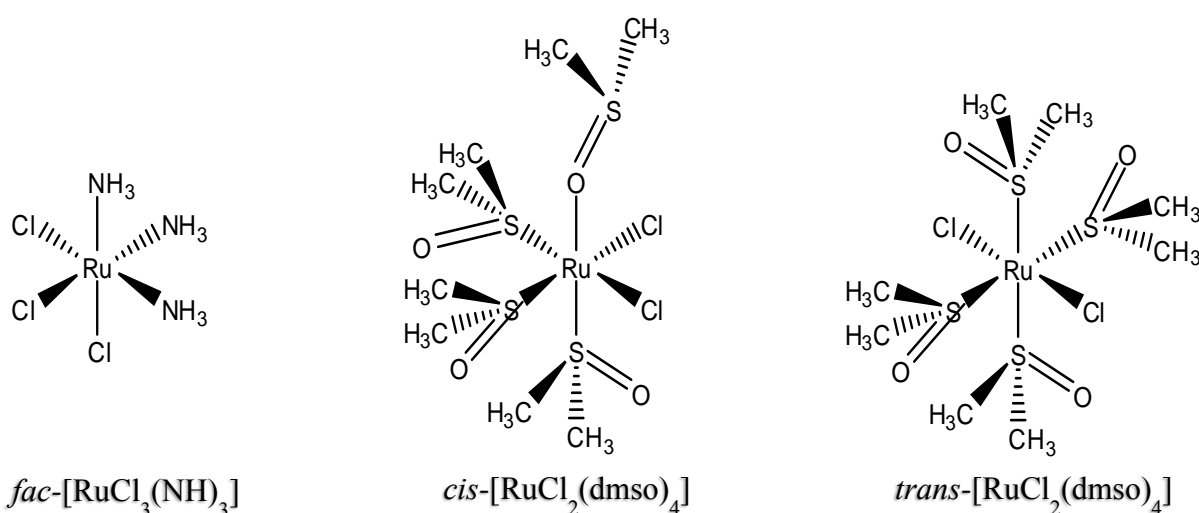
Шема 6. Предложени механизам активације комплекса рутенијума(III)

Још једна важна особина комплекса рутенијума(III) је способност да замени гвожђе при везивању за многе биомолекуле, укључујући серум протеине (нпр. трансферин и албумин). Рутенијум се везује за трансферин, при чему настаје трансферин-рутенијумски комплекс који може бити активно транспортован у туморска ткива на чијој се површини налази знатно већи број трансферинских рецептора у односу на здрава ткива. (209) Када се једном везе за трансферински рецептор, комплекс ослобађа рутенијум који се може лако интернализovati у тумор. (210) Верује се да је ово други узрок селективног деловања комплекса рутенијума према ћелијама канцера што доводи и до смањења споредних нежељених ефеката терапије. (211)

1.4. Антитуморски комплекси рутенијума

Први комплекси рутенијума тестирани на антитуморску активност су хлоро-амин- Ru(III) комплекси јасно инспирисани цисплатином, за које се сматрало да реагују примарно са ДНК. *Clarke* је заједно са својим сарадницима први објавио резултате о антитуморској активности комплекса $\text{fac-[RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ (Слика 7). (212) Испитивања су показала да има чак и већу активност у односу на цисплатину у случају леукемије P388. Међутим, недостатак и велики проблем у примени овог комплекса представља његова слаба растворљивост у физиолошком раствору, па због тога никада није нашао

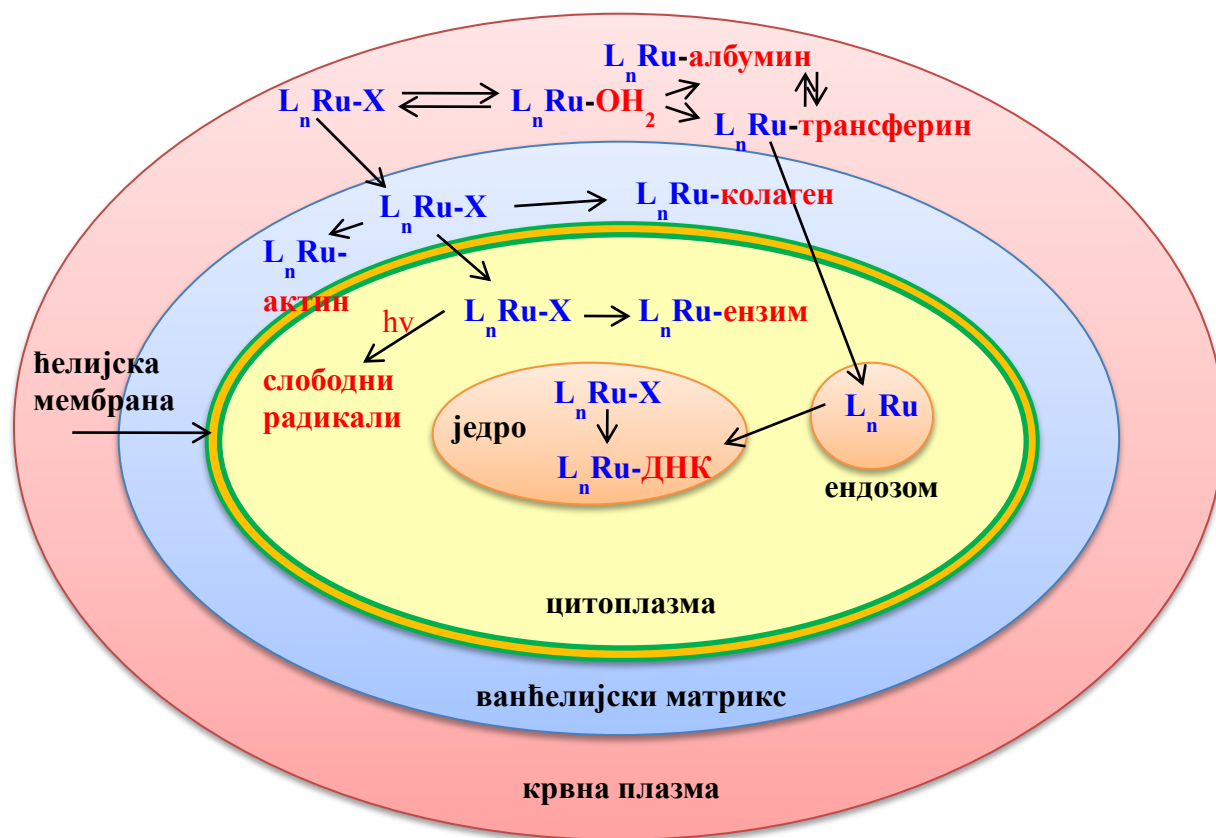
фармаколошку примену. Испитана је и цитотоксичност још једног рутенијум-аминског комплекса, који се користи као средство за бојење алдехид фиксираних мукополисахарида у хистологији, тзв. рутенијум црвено. Сматра се да ова цитолошка боја инхибира транспорт Ca(II) у ћелију селективним везивањем за Ca(II) транспортујуће протеине. (212)



Слика 7. Структурне формуле неких комплекса рутенијума који показују антитуморску активност

Mestroni је са својим сарадницима испитивао антитуморску активност рутенијум(II) комплекса, *cis*-[RuCl₂(dmsO)₄] (dmsO = диметилсулфоксид) (Слика 7). (213) Овај комплекс није цитотоксичан *in vitro*, а *in vivo* је показао токсичност три пута мању у односу на цисплатину. Ипак, при максималној толерантној дози овај комплекс је показао велику активност и према примарном тумору и према метастазама на примеру миша са чврстим метастазирајућим тумором. (214) На моларној основи, цитотоксичност *trans* изомера (Слика 7) је чак око 20 пута већа у односу на *cis* изомер и овај комплекс је ефикаснији у смањењу броја и тежине спонтаних метастаза које потичу од примарних тумора. У експериментима на мишевима којима је оперативно уклоњен примарни тумор, *trans*-[RuCl₂(dmsO)₄] је ефикаснији у односу на цисплатину по питању постоперативног продужења животног века. Другим речима, овај *trans* изомер је показао мању активност према примарном тумору, али већу селективност и ефикасност према метастазама. (213) Ова чињеница указала је на разлику у механизму реакција комплекса рутенијума у односу на комплексе платине. (215)

Ревиије о антитуморској активности комплекса рутенијума, које су објављене последњих десетак година, концентришу се на NAMI-A (216) и KP1019,(217) или на групу комплекса са сличним лигандима, као што су амини, полипиридили, (218) полиаминкарбоксилати, (219) или арени, (220, 221) као и на различитим врстама реактивности у биолошкој средини. Са друге стране, скорашњи радови указују на сличности у механизму деловања различитих типова антиканцерогених комплекса рутенијума. На пример, специфична антиметастатска активност која је до скоро сматрана као јединствена особина комплекса NAMI-A, такође је демонстрирана и за RAPTA рутенијум(II) арена комплексе. (222) Као и код NAMI-A, антиметастатска активност рутенијум(II) арена комплекса је у вези са интеракцијом са ванћелијским матриксом и површином ћелије, пре него са ДНК у ћелијском нуклеусу. (222) У прошлости, многа испитивања су концентрисана на везивање комплекса рутенијума за ДНК и његове компоненте, (212, 218, 23) док је од недавно главни фокус усмерен ка интеракцијама са протеинима крвне плазме. (223)



Шема 7. Предложени активациони путеви антиканцерогених комплекса рутенијума (L су инертни лиганди, а X је одлазећа група)(202)

На основу Шеме 7 можемо видети да постоје два главна метаболичка пута рутенијум комплекса опште формуле L_nRu-X , где су L инертни лиганди као што су арена или N-донори, а X је одлазећа група као што је хлоридо или карбоксилато:

- пропустљивост ћелије пасивном дифузијом или специфичним транспортним механизмом из ванћелијског у унутарћелијски простор и
- хидролиза комплекса и везивање за одговарајуће биомолекуле.

Након интравенске администрације, комплекс рутенијума може подлећи хидролизи у крвној плазми у већој или мањој мери, а затим везивању за серум протеине, као што су албумин или трансферин (Шема 7). (223) Предложени механизам је да се рутенијум(II) ослобађа из рутенијум(III)-трансферинског комплекса унутар ћелије, при чему се редукција врши глутатионом или аскорбинском киселином.(217) Међутим, уколико рутенијум(III) доспе у ћелију у облику стабилног комплекса са трансферином, следиће метаболички пут гвожђе(III)-трансферинског комплекса, укључујући везивање за трансферинске рецепторе на површини ћелије, затим енкапсулацију у ендозому (Шема 7), из ког се ослобађа као комплекс рутенијума(II) комбинацијом ензимске редукције и смањене рН вредности у ендозому. (224)

Уколико се комплекс рутенијума не веже за протеине у крвној плазми, може дифундовати у ванћелијски матрикс и формирати адукте са колагеном или протеинима на површини ћелије (као што је актин) који могу бити одговорни за антиметастатску активност NAMI-A (25) и рутенијум(II) арена комплекса. (222)

Неизреаговани комплекс може даље дифундовати кроз ћелијску мембрану у цитоплазму (Шема 7) и везати се за активне центре разних ензима, ковалентно (225) или нековалентно. (226) На крају, врсте које стигну до ћелијског нуклеуса, дифузијом или транспортним механизмом, могу формирати ДНК адукте. (218) Способност да се прати пут комплекса рутенијума из крвне плазме до ћелије, као и хемијске трансформације рутенијума, су од изузетне важности за разумевање механизма антитуморске активности комплекса рутенијума.

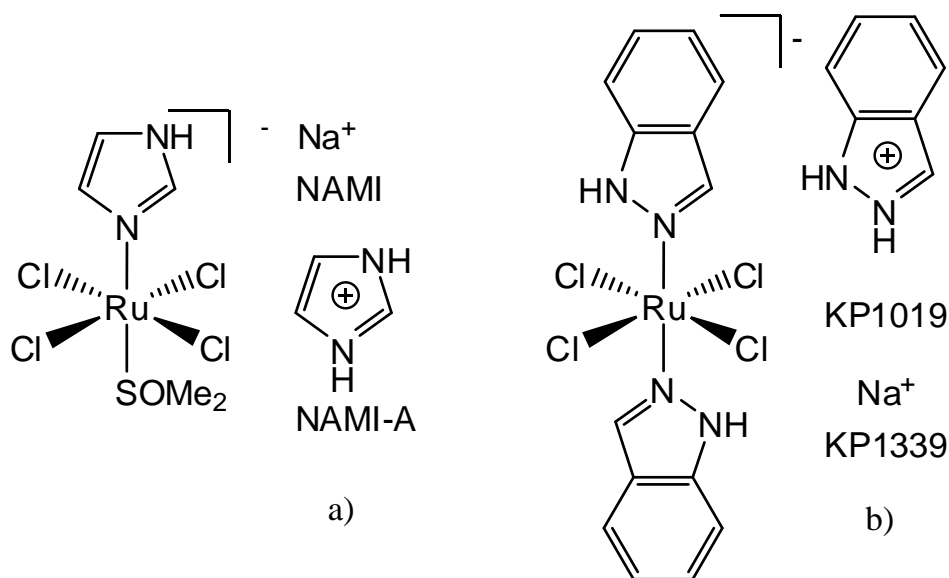
1.5. Комплекси рутенијума(III)

Истраживања комплекса рутенијума постају интензивнија након открића антитуморске активности два изоелектронска, анјонска комплекса рутенијума(III) са хетероцикличним базама: NAMI-A, $[Him]trans-[RuCl_4(im)(dmsO-S)]$ (im = имидазол),

синтетисан од стране Alessio-ове групе и KP1019, [Hind]trans-[RuCl₄(ind)₂] (ind = индазол), синтетисан од стране Keppler-ове групе (Слика 8).

1.5.1. NAMI-A

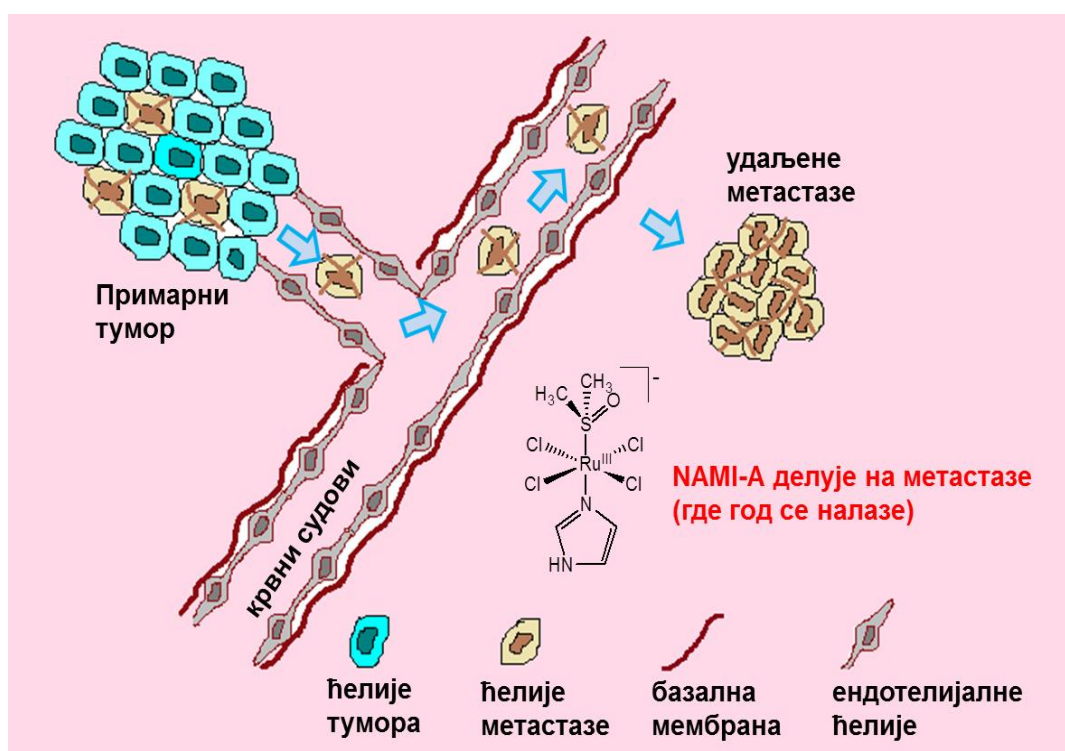
Раних 90-тих синтетисан је комплекс [Na]trans-[RuCl₄(im)(dmsO-S)] (NAMI) (Слика 8а), који је посебно активан према чврстим метастазирајућим туморима. (227) У преклиничким истраживањима NAMI је замењен својим аналогом, односно имидазолном сољу истог комплекса, NAMI-A [Him]trans-[RuCl₄(im)(dmsO-S)] (Слика 8а). Ово је први комплекс рутенијума који је ушао у фазу I клиничког испитивања, 1999. године, на холандском Институту за борбу против рака у Амстердаму. NAMI-A поседује повољне биолошке и хемијске карактеристике: добра антиметастатска активност, ниска општа токсичност, лака и репродуктивна припрема, добра стабилност, а те особине иницирају његов даљи развој. Успешно је завршена I фаза испитивања на 24 пацијента, показујући добру подношљивост широког опсега суб-токсичне дозе без неочекиване токсичности.



Слика 8. Структурне формуле комплекса рутенијума(III) а) [Him]trans-[RuCl₄(im)(dmsO-S)] или NAMI-A, б) [Hind]trans-[RuCl₄(ind)₂] или KP1019

1.5.1.1. Механизам деловања

Механизам деловања NAMI-A је још увек недовољно познат. *In vitro* и *in vivo* испитивања показују да се снажно везује за протеине плазме, албумин и трансферин. (228) NAMI-A показује способност интеракције и са ДНК, али сматра се да то није примарна мета. Интеракција са актинима унутар ћелије или са колагеном ванћелијског матрикса (23) који доводе до редуковане мобилности инвазивних ћелија канцера, предложена је као могући механизам антиметастатског дејства NAMI-A. Показује способност не само да превентира формирање метастаза већ и да инхибира њихов раст када су већ успостављене. (229) На Шеми 8 приказан је механизам деловања комплекса NAMI-A.



Шема 8. Селективно дејство NAMI-A на метастазе тумора. Резултат је слаба редукација примарног тумора (где метастазе представљају субпопулацију) и изражено, скоро потпуно уклањање метастаза (где ћелије које метастазирају представљају скоро 100% укупних ћелија) (230)

Предложени механизам дејства укључује (21) :

- интеракцију са регулацијом ћелијског циклуса која резултује у пролазној акумулацији ћелија у G₂/M фази;
- инхибицију матриксних металопроотеиназа и активацију адхезионих молекула;
- повећање дебљине капсуле око примарног тумора и ванћелијског матрикса око крвних судова, чиме спречава туморске ћелије да продиру у околно ткиво и крвне судове и
- везивање за нуклеинске киселине, показујући директни ефекат на ДНК туморских ћелија.

1.5.2. KP1019

Истовремено са развојем комплекса NAMI-A од стране Alessio-а и сарадника са Универзитета у Трсту, Keppler и његови сарадници са Универзитета у Бечу су синтетизовали рутенијум(III) комплекс [Hind]trans-[RuCl₄(ind)₂] (ind = индазол), KP1019 (Слика 86). KP1019 показује велику активност према примарним цисплатина резистентним колоректалним туморима, али не показује значајну антиметастатску активност. Овај комплекс је ушао у I фазу клиничких испитивања 2004. године при чему су добијени обећавајући резултати: пет од шест доступних пацијената доживело је стабилизацију болести и лечење које је праћено једино умереном токсичношћу, што може бити узрок високог степена везивања за серум протеине и селективне активације у ткиву тумора. (217) Међутим, због релативно слабе растворљивости овај комплекс је замењен својим аналогом, односно натријумовом сољу KP1339, за даља клиничка испитивања. Комплекс је прилично стабилан у инфузионом раствору што је од важног значаја за складиштење и транспорт комплекса као и за клиничку употребу. Брзина реакције хидролизе зависи од температуре и рН вредности раствора. У води на собној температури мала количина комплекса (око 2%) хидролизује у току једног сата дајући одговарајући моноаква комплекс, док у раствору пуфера на рН 6,00 и 7,40 полувремена реакције су 5,4 и 0,5 сати (на 310 К).

1.5.2.1. Механизам деловања

Након интравенског уношења комплекса предложени механизам је следећи (Шема 9):

- хидролиза комплекса у крви праћена интеракцијом са серум протеинима као што су албумин и трансферин;
- транспорт комплекса у ћелију преко трансферинског циклуса;
- ослобађање комплекса проузроковано нижом рН вредношћу;
- редукција у хипоксичној ћелији тумора;
- везивање за нуклеинске киселине и
- индукција апоптозе преко митохондријалног пута.

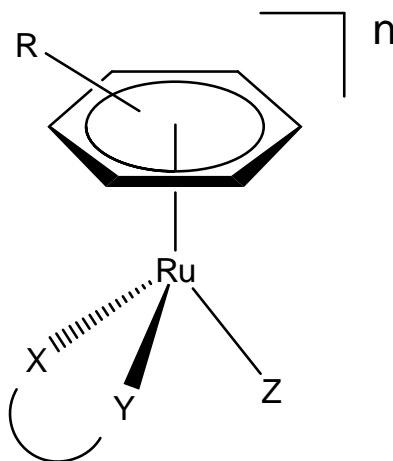


Шема 9. Предложени механизам деловања KP1019 (231)

1.6. Органометални рутенијум(II) арена комплекси

Последњих година многобројна истраживања су фокусирана на органометална „half-sandwich”, рутенијум(II) арена једињења, која поседију антитуморску активност у *in vitro*, а у неким случајевима, и у *in vivo* условима. Органометални рутенијум(II) комплекси опште формуле $[(\eta^6\text{-арен})Ru(XY)Z]$ (Слика 9), где је арен бензен или

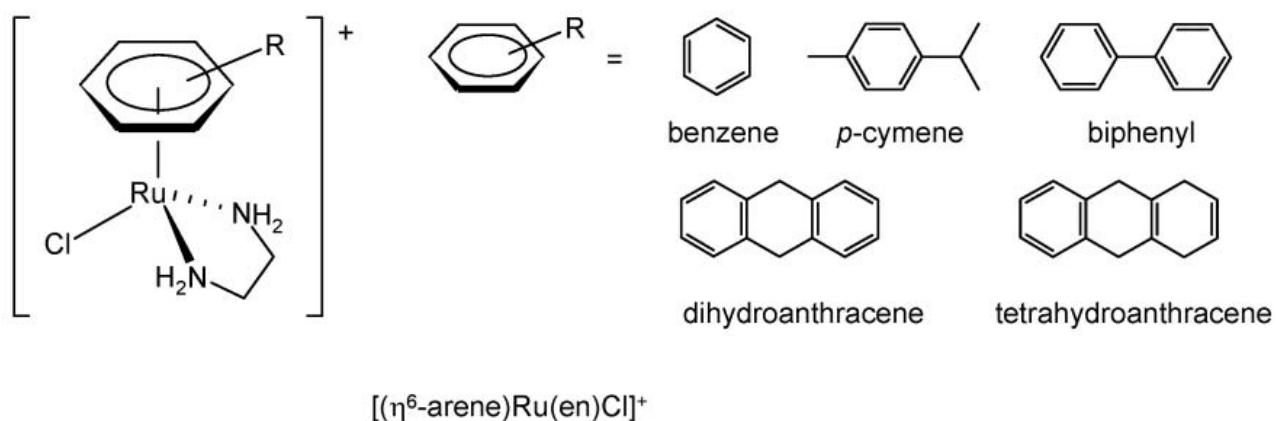
дериват бензена, XY неутрални или моноанјонски *N,N*-, *N,O*- или *O,O*-хелатни лиганд и Z халоген, интензивно су истраживана од стране Sadler-а и његових сарадника. (232)⁵² (233) Ови комплекси имају *pseudo*-октаедарку „piano-stool” структуру са неутралним арена лигандом који заузима три координациона места и чини „седиште столице за клавир”, а хелатни лиганд заједно са халогеном чини „ноге столице”.



Слика 9. Општа структура рутенијум(II) арена комплекса

Структура рутенијум(II) арена комплекса, дозвољавајући варијације три главне градивне компоненте (монодентатни лиганд Z, бидентатни лиганд XY и арен), омогућава fino подешавање фармаколошких особина ових комплекса. (221) Присуство координованог аренског лиганда пружа хидрофобне особине комплексу и стабилизује рутенијум у +2 оксидационом стању, тако да је оксидација до рутенијума(III) веома тешка. Природа арена лиганда може да потпомогне усвајање комплекса и интеракције са потенцијалним биолошким метама. Одлазећа група, која је обично хлорид и ослобађа место на металу за везивање биомолекула, може бити од важности за контролу кинетике активације комплекса. Супституција хлорида неким другим халогеном (бромидом или јодидом) има врло мали утицај на цитотоксичност комплекса. Хелатни лиганд може да одреди стабилност и кинетику супституције лиганда у комплексу. Комплекси који садрже бидентатни хелатни лиганд показују већу активност у односу на комплексе са монодентатним лигандом. (234)

Интензивна истраживања односа структуре и активности одговарајућих комплекса показала су да су најактивнији комплекси са хелатним лигандом XY = en и одлазећом групом Z = Cl. Заиста, комплекси $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (Слика 10) показали су обећавајућу антиканцерогену активност, *in vitro* према канцерогеним ћелијским линијама, укључујући цисплатина резистентне канцерогене ћелије AR2780cis, и *in vivo* са значајним спречавањем раста A2780 и A2780cis ћелија. (232)⁵³ (235)



Слика 10. Рутенијум(II) арена комплекси са различитим арена лигандима

Цитотоксичност расте са повећањем величине координованог арена: бензен (ben) < p-цимен (cym) < бифенил (bir) < дихидроантрацен (DNA) < тетрахидроантрацен (ТНА), тако да *bir* комплекс има сличну цитотоксичност као и карбоплатина ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$), а ТНА комплекс показује активност као и цисплатина ($\text{IC}_{50} = 0,6 \mu\text{M}$) (Табела 9). Структурне формуле неких од поменутих комплекса приказане су на Слици 10. Комплекси опште формуле $[(\eta^6\text{-сум})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ (X, Y или Z = халид, ацетонитрил или изоникотинамид), са три монодентатна лиганда, не показују активност према A2780 ћелијама канцера јајника *in vitro*. (236) Ови комплекси могу бити сувише реактивни са компонентама ћелијских култура и ћелија, и деактивирани од стране биомолекула пре него што стигну до жељене мете везивања.

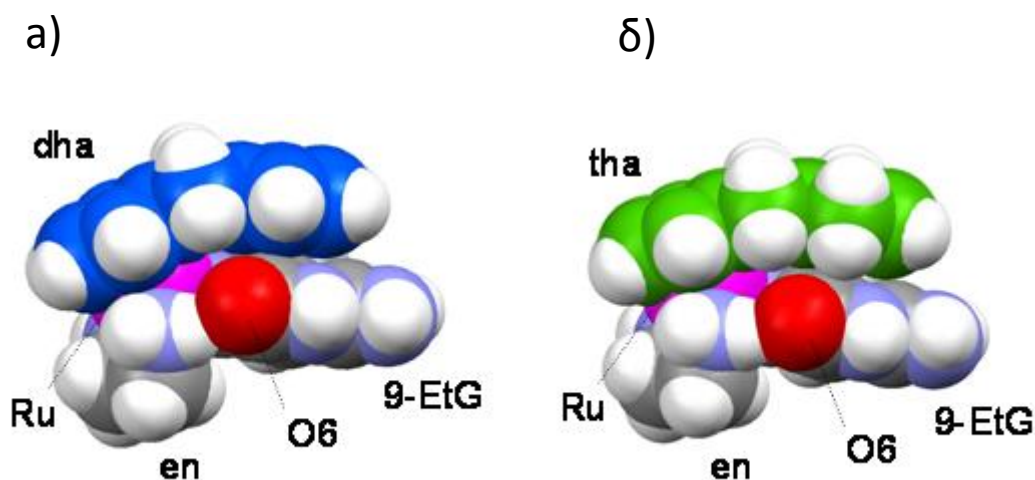
Табела 9. IC₅₀ вредности рутенијум(II) арена комплекса [(η⁶-арен)Ru(X)(Y)Cl]A [A = PF₆⁻ за позитивно наелектрисане комплексе], карбоплатине и цисплатине у А2780 ћелијама канцера јајника након 24 сата излагања леку. (234)

Арен/Pt комплекс	X	Y	IC ₅₀ (μM)
<i>p</i> -цимен	CH ₃ CN	CH ₃ CN	> 100
<i>p</i> -цимен	Cl	Изоникотинамид	> 100
C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₃	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		56
бензен	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		17
<i>p</i> -цимен	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		10
<i>Карбоплатина</i>			6
C ₆ H ₅ C ₆ H ₅	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NEtH		6
C ₆ H ₅ C ₆ H ₅	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		5
дихидроантрацен	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		2
<i>Цисплатина</i>			0,6
тетрахидроантрацен	H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂		0,5

1.6.1. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама

Изучавање интеракција рутенијум(II) арена комплекса са нуклеобазама је од изузетне важности с обзиром да је ДНК примарна мета антитуморских комплекса као што је цисплатина. Стога, испитиване су реакције комплекса [(η⁶-арен)Ru(en)X]ⁿ⁺, где је η⁶-арен = bipy, ТНА, ДНА, *p*-суп и Ph, X = Cl⁻ или H₂O, са дериватима нуклеинских киселина као моделима ДНК од стране Sadler-ове групе. (237) Испитивања су показала претежно формирање монофункционалног производа преко N7 азотовог атома гуанина. Реактивност различитих места координовања нуклеобаза према рутенијуму(II) при неутралној рН опада у следећем низу: гуанозин(N7) > тимидин(N3) > цитидин(N3) > аденозин(N7) > аденозин(N1). Производи интеракције са 9-етилгуанином (9EtG) су изоловани и окарактерисани помоћу рендгенске структурне анализе (Слика 11). Уочена је селективна Ru-N7(гуанин) координација која је додатно стабилизована

стереоспецифичном водоничном везом између C6=O гуанина и NH групе en, као и π - π интеракцијама између ароматичног лиганда и нуклеобазе. (232)

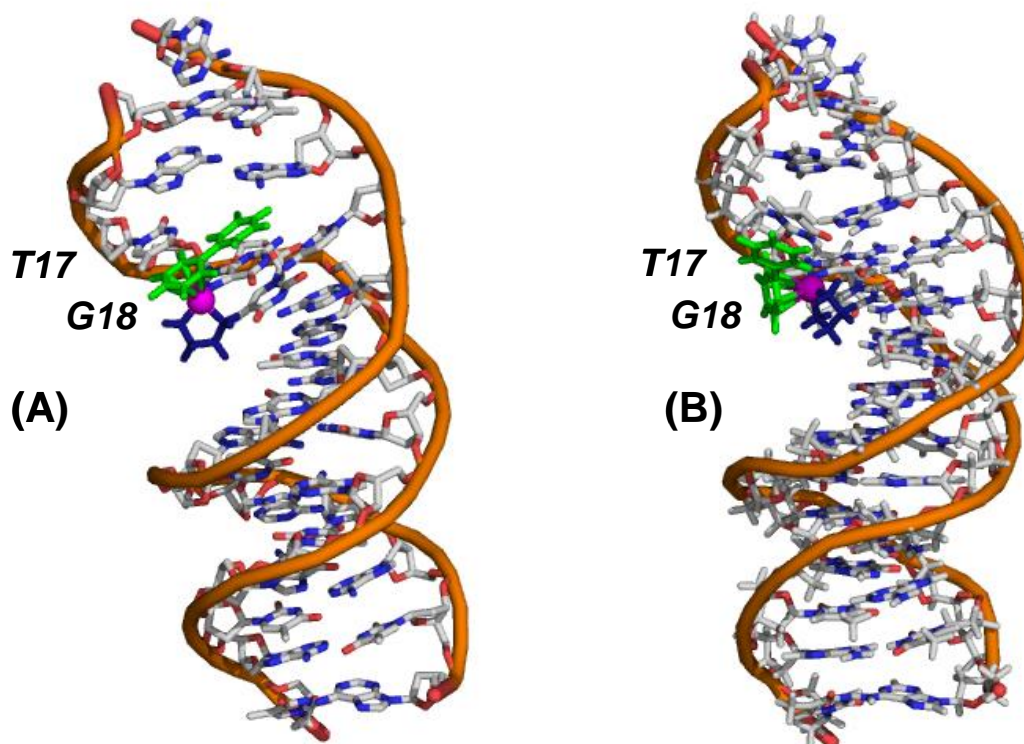


Слика 11. Кристалне структуре а) $[(\eta^6\text{-DHA})\text{Ru}(\text{en})(9\text{EtG})]^{2+}$ и б) $[(\eta^6\text{-THA})\text{Ru}(\text{en})(9\text{EtG})]^{2+}$, представљајући арена-пурин π - π интеракцију и водоничну везу између NH en и C6O гуанина(G) (232)

1.6.2. Интеракције рутенијум(II) арена комплекса са олигонуклеотидима и ДНК

Интеракција рутенијум(II) арена комплекса са ДНК је од посебне важности, јер ДНК може бити крајња мета за ову врсту потенцијалних антитуморских агенаса. Комплекс $[(\eta^6\text{-}p\text{-sum})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ се везује селективно за гуанин (G) на олигонуклеотидима, формирајући монофункционалне производе Ru-G7 и Ru-G8, као и бифункционални производ G7(Ru)-G8(Ru). (236) Интеракција комплекса $[(\eta^6\text{-}bip)\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ са дуплексом d(ATACATGGTACATA)-d(TAT¹⁷G¹⁸TACCATGTAT) је проучавана помоћу HPLC-ESI-MS методе, као и помоћу 2D NOESY NMR спектроскопије. Такође, нађено је да се координација рутенијума одиграва преко N7 атома G, везујући се моно- и бифункционално за олигонуклеотид. На једном конформеру уочена је интеркалација арена лиганда (*bip*) између G18 и суседног тимина (T17), док на другом конформеру нема интеркалације, већ је арена лиганд наслоњен на благо савијен T17 (Слика 12). (239)

Интеракцијом рутенијум(II) арена комплекса са ДНК дуплексом долази до координације претежно за N7 азотов атом G остатка. Поред тога, присутне су и некоординативне интеракције као што су електростатичке интеракције, јака интрамолекуларна водонична веза између NH групе en и C6O гуанина и хидрофобне π - π интеракције између ароматичног лиганда и база ДНК. (240)



Слика 12. Молекуларни модели два конформера 14-мер $d(ATACATGGTACATA)-d(TAT^{17}G^{18}TACCATGTAT)$ за које је везан монофункционални фрагмент $\{(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$ преко N7 атома гуанина (G18) а) показујући интеркалацију арена између G18 и T17 и б) нема интеркалације, већ је арена лиганд наслоњен на благо савијен T17. (Рутенијум је представљен љубичастом бојом, en тамно плавом и арена лиганд зеленом) (238)

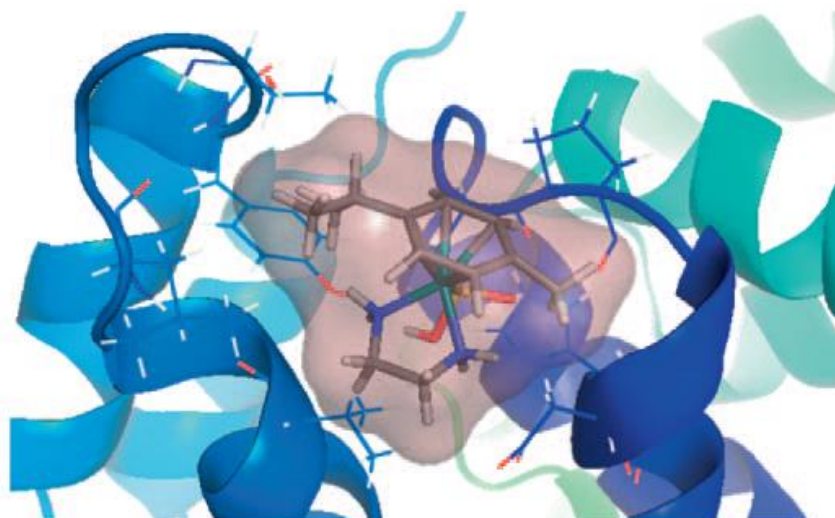
1.6.3. Реакције са аминокиселинама и протеинима

Реакције рутенијум(II) арена комплекса са аминокиселинама које садрже сумпор, као што су L-цистеин (L-Cys) и L-метионин (L-Met), су од великог интереса у погледу

јаког утицаја на интрацелуларну хемију антитуморских комплекса платине, посебно њихово ангажовање у детоксификацији и механизму резистенције. (241) Протеини могу такође имати важну улогу у механизму деловања рутенијум(II) арена комплекса, укључујући могућност да рутенијум може заменити гвожђе у протеинима.

Sadler је са својим сарадницима испитивао интеракцију рутенијум(II) арена комплекса са аминокиселинама, L-Cys и L-Met. (242) На основу експерименталних резултата, нађено је да $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ комплекс реагује споро са тиолном аминокиселином L-Cys (1:2) у воденом раствору на 310 K, дајући на почетку реакције три мононуклеарна производа, при чему је цистеин координован за рутенијум преко сумпора или кисеоника. Након 24 сата уочена су и два динуклеарна производа која настају као резултат губитка координованог етилендиамина и садрже један или два мостна цистеинска лиганда. При високим концентрацијама L-Cys долази и до грађења неубичајеног кластера $\{(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}\}_8$. Интеракција са тиоетарским сумпором L-Met је такође слаба и само 28% $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ комплекса реагује дајући само један производ $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})(\text{L-Met-S})]^{2+}$. Слаба реактивност испитиваног арена комплекса са одговарајућим аминокиселинама које садрже атом сумпора у бочном низу, и висока реактивност према гуанину, указује да се адукти са ДНК могу формирати чак и у присуству аминокиселина, пептида и протеина. У супротности са тим, сматра се да се рутенијум(III) комплекси везују јаче за протеине као што су албумин и трансферин него за ДНК, при чему протеин може послужити за доставу комплекса до канцерогених ћелија. (243) Ово указује да се механизам деловања рутенијум(II) арена антиканцерогених комплекса разликује од механизма рутенијум(III) комплекса.

Интеракције два арена комплекса, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ и $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, са хуманим серум албумином, испитиване су помоћу масене спектрометрије (MS). (244) Добијени резултати показују да се оба комплекса координују за хистидин (His128, His247, His510) и за метионин (Met298) на површини албумина. Поред тога, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ комплекс може ући у шупљину протеина, везати се за Cys34 и изазвати оксидацију тиолата до сулфината (Слика 13). С обзиром да се Cys34 налази унутар шупљине, $[(\eta^6\text{-bip})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ комплекс се не може координовати за Cys34, због фенил прстена који представља стерну сметњу. Закључено је да арена лиганд има кључну улогу у интеракцијама са протеинима. Стога такве оксидационе реакције тиола изазване координацијом рутенијума могу бити веома значајне у фармаколошкој активности ових рутенијум(II) комплекса.



Слика 13. Структура $[(\eta^6\text{-}p\text{-сум})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ комплекса са хуманим албумином. Рутенијум је координован за Cys34 који се налази у шупљини протеина. (244)

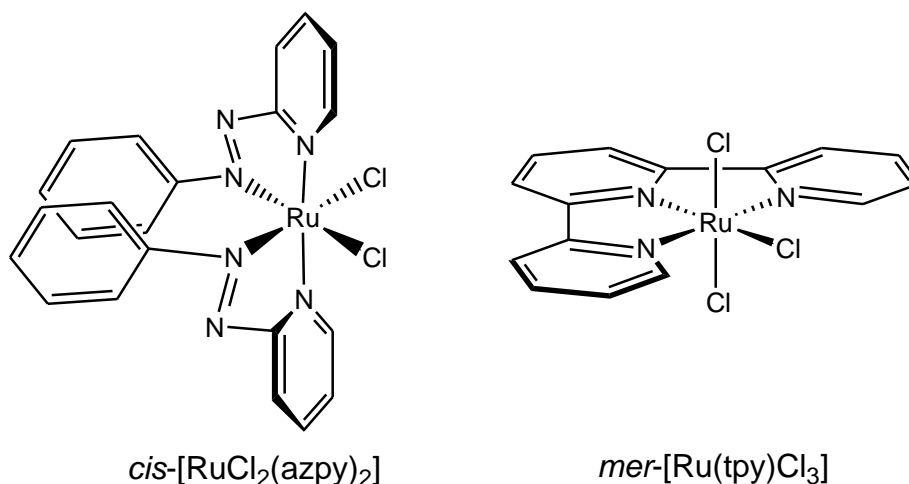
1.7. Рутенијум(II) полипиридил комплекси

Последњих неколико деценија, рутенијум полипиридил комплекси су били мета многобројних истраживања као могућа алтернатива за коришћење у класичној хемотерапији. (241, 245) За неке од њих је пронађено да поседују обећавајућу антитуморску активност. Директна веза између цитотоксичности и координовања рутенијум полипиридил комплекса за ДНК је покренута од стране *Brabec-a* и његових сарадника. (245) Цитотоксичност три хлорополипиридил рутенијум(II) комплекса, $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})\text{Cl}][\text{Cl}]$, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ и $\text{mer-}[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ ($\text{tpy} = 2,2',6',2''\text{-терпиридин}$), испитивана је према разним ћелијским линијама тумора. (245) Комплекс $\text{mer-}[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ (Слика 14) је показао знатно већу цитотоксичност у односу на друга два комплекса. Висока активност овог комплекса предпоставља се да потиче од његове способности да везује ДНК преко два деривата гуанина у *trans* положају, на супротним ланцима, за разлику од мање активног комплекса, $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$. (246) Reedijk и његови сарадници су показали да $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ формира моноадукт са 9-етилгуанином (9EtG), као и да кристална структура $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}(9\text{EtG})][\text{Cl}]$ комплекса открива координацију 9EtG преко N7 азотовог атома. (247) Са друге стране, Alberto и његови сарадници су пронашли, при истим условима, квантитативну координацију два деривата гуанина (9MeG) у *cis* положају преко N7 атома. (248)

Током претходних година, синтетизован је велики број монофункционалних рутенијум(II) терпиридин комплекса опште формуле $mer-[Ru(tpy)(N-N)Cl]^+$ ($N-N$ = бидентатни азот-донорски хелатни лиганд). (249) Проучавана је њихова способност везивања за ДНК, при чему је пронађено да се већина ових комплекса ковалентно везује за N7 атом гуанина, формирајући монофункционалне производе, а неки од њих стопирају репликацију ДНК. (245)

Три изомерна рутенијум(II) полипиридил комплекса, α -, β - и γ - $[RuCl_2(azpy)_2]$ ($azpy$ = 2-фенилазопиридин) су тестирана на серије ћелијских линија канцера: MCF-7, EVSA-T, WIDR, IGROV, M19, A498, H266 и A2780. (250) Комплекс α - $[RuCl_2(azpy)_2]$ (Слика 14) је показао највећу активност са IC_{50} вредношћу 0,86 и 0,98 μM према A2780 и A2780 cisR, што је у истом опсегу као и цитотоксичност рутенијум(II) арена комплекса према истим ћелијским линијама. (236) Испитивана је интеракција ових комплекса са 9-етилгуанином и гуанозином, при чему долази до формирања монофункционалних производа.

Tris(лиганд) комплекси $[RuL_3][PF_6]_2$ (L = 2-фенилазопиридин или *o*-толилазопиридин) као и комплекси опште формуле $[RuL_2L''][PF_6]_2$ (L = 2-фенилазопиридин или *bpy*) су синтетизовани, структурно окарактерисани и испитивани на цитотоксичну активност. (251) Ови комплекси су дизајнирани како би се испитала хипотеза да α - $[RuCl_2(azpy)_2]$ комплекс поседује високу цитотоксичност због два *cis* хлоридо лиганда, која могу бити замењена при интеракцији са ДНК, као у случају цисплатине. Комплекси $mer-[Ru(azpy)_3][PF_6]_2$ и $mer-[Ru(tazpy)_3][PF_6]_2$ су показали цитотоксичну активност за серију ћелијских линија канцера (MCF-7, EVSA-T, WIDR, IGROV, M19, A498, H266). Тако да, чак и у одсуству хлоридо лиганда, примећена је цитотоксична активност. То би значило да 2-фенилазопиридин рутенијум(II) комплекси делују потпуно другачијим механизмом у односу на цисплатину.



Слика 14. Структурне формуле неких рутенијум(II) полипиридил комплекса који показују цитотоксичну активност, где је *azpy* 2-фенилазопиридин и *tpy* 2,2',6',2''-терпиридин

Биолошки релевантна истраживања су ограничена за већину рутенијум(II) терпиридин комплекса код којих је, такође, присутан N-N полипиридил лиганд (нпр. *bpy*), због ниске растворљивости у воденом раствору. Овај проблем је довео до смањеног интересовања у области антиканцерогене активности *mer* комплекса у односу на комплексе фацијалне геометрије. Имајући то у виду, било је од значаја усмерити испитивања ка синтези и карактеризацији рутенијум(II) терпиридин комплекса меридијалне геометрије и испитивању њихових интеракција са ДНК нуклеобазама. Синтетисана је серија рутенијум(II) комплекса опште формуле $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$, где је L_3 *tpy* или *Cl-tpy* (4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин), *X* је *Cl* или *dmsO-S*, *N-N* је бидентатни хелатни лиганд, који има способност водоничног везивања са нуклеобазама (*N-N* = 1,2-диаминоетан (*en*) или 1,2-диаминоциклохексан (*dach*)), *Y* је *Cl*, PF_6 или CF_3SO_3 , *n* = 1 или 2 у зависности од природе лиганда *X*.

Интеракција рутенијум(II)-*tpy* комплекса са дериватима гуанина (9MeG и 5'-GMP) испитивана је помоћу NMR спектроскопије и UV-Vis спектрофотометрије. Ред реактивности испитиваних комплекса за реакцију супституције са 9MeG и 5'-GMP зависи од природе хелатног лиганда $[Ru(Cl-tpy)(dach)(Cl)]^+ > [Ru(Cl-tpy)(en)(Cl)]^+$, као и од наелектрисања улазног лиганда (5'-GMP > 9-MeG). Интеракцијом испитиваних рутенијум-*tpy* комплекса са дериватима гуанина настаје само један монофункционални производ Ru-(N7)DNA.

Последњих година велики број истраживања је усмерен ка испитивању интеракција рутенијум(II/III) комплекса са серум протеинима и аминокиселинама које садрже сумпор. Ове интеракције су веома важне јер након интравенског уношења комплекса рутенијума, протеини плазме постају потенцијалне мете за координовање рутенијум(II/III) комплекса. Експериментални подаци прикупљени до сада пружају информацију о нижој реактивности аминокиселина и протеина према рутенијум(II) комплексима. Релативно слаба веза аминокиселина и протеина са овим комплексима може бити одговорна за транспорт и допремање комплекса рутенијума до канцерогених ћелија, односно неке аминокиселине, а пептиди и протеини могу да служе као резервоари рутенијума. Ово може бити и узрок мањих споредних нежељених ефеката комплекса рутенијума у односу на комплексе платине.

2. ЦИЉЕВИ

Основни циљ овог истраживања је синтетисање и карактерисање нових комплекса рутенијума који показују антитуморску активност *in vitro* и *in vivo* у моделу експерименталног карцинома колона. У складу са овим циљем, испитаће се антитуморски ефекат претходно окарактерисаних комплекса рутенијума *in vitro* на ћелијским линијама хуманог и мишјег карцинома колона и утицај рутенијум(III) комплекса $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}_3]$ где $\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}} = 2,6\text{-бис}(5\text{-терц-бутил-1H-пиразол-3-ил})\text{пиридин}$ на раст примарног хетеротопског карцинома колона изазваног субкутаном инјекцијом СТ26 ћелија у дорзалну регију BALB/с миша. Такође, циљ овог истраживања је и испитивање кинетике и механизма реакције новосинтетисаних комплекса рутенијума са биолошки активним молекулама као што су аминокиселине и ДНК.

Антитуморски ефекат комплекса рутенијума биће евалуиран на основу следећих параметара:

1. Испитивања вијабилности туморских ћелија након излагања испитиваним комплексима МТТ методом;
2. Процене апоптотске смрти бојењем третираних ћелија Анексином V и пропидијум јодидом и анти-Noxa антителима и анализирањем проточном цитометријом и TUNEL методом у ткиву примарног СТ26 тумора;
3. Анализом ћелијског циклуса и експресије маркера пролиферације Ki67 у третираним ћелијама;
4. Мерењем раста примарног тумора и инциденце метастазирања у јетру и плућа и одређивањем процента ткива захваћеног метастазама;
5. Испитивањем потенцијално токсичних ефеката комплекса рутенијума одређивањем концентрације трансаминаза, урее и креатинина у серуму и анализом појединих ћелијских популација у слезини.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Синтеза комплекса

Као прекурсор за синтезу рутенијум(II) терпиридин комплекса коришћен је $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$ (**P1**) (251) синтетисан по модификованом поступку који је раније описан у литератури.

3.1.1. Синтеза прекурсора

$[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$ (**P1**). (252) 303,3 mg $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,160 mmol) је растворено у 100,0 ml етанола и раствор је рефлуктован све док се боја не промени из браон у зелену (око 2 сата). Затим је додато 282,2 mg Cl-tpy (1,054 mmol) и настављено рефлуктовање још 4 сата. Током рефлуктовања боја раствора је поново промењена у браон-црвенкасту са истовременим формирањем браон талоба. Након хлађења раствора на собној температури, талог је сакупљен филтрирањем, испран етанолом и етром и осушен под вакуумом. Принос: 452,4 mg (90%). Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{Cl}_4\text{N}_3\text{Ru}$ (475,14): C, 37,9; H, 2,12; N, 8,84. Нађено: C, 37,9; H, 2,15; N, 8,87. Комплекс **P1** је растворан у DMSO-у и ацетонитрилу, слабо растворан у води, метанолу и етанолу, док је нерастворан у ацетону, хлороформу и дихлорметану. IR (KBr, cm^{-1}): ν_{tpy} 3048 (m), 2924 (w), 1590 (s), 1470 (w), 1419 (m), 1145 (s), 794 (s), 579 (w); $\nu_{\text{Ru-Cl}}$ 316 (m). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 273 (21460), 313 (18092), 320 (17781), 408 (5749), 487 (3186).

3.1.2. Општи поступак за синтезу $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1Cl** - **4Cl**) комплекса:

Измерена количина $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$ (**P1**) је додата у смешу етанол/вода (3:1) која садржи 10 eq. LiCl и 3 eq. триетиламина (Et_3N) као редукционо средство. Затим је додат хелатни лиганд *N-N* (1,2 eq.; *N-N* = en, dach, bpy, pic) и смеша је рефлуктована око 3 сата уз снажно мешање. Врућ љубичаст раствор је процеђен да би се уклонио нерастворан материјал. Упаравање на ротационом упаривачу под сниженим притиском до око $\frac{1}{4}$ полазне запремине и складиштење на $4,0^\circ\text{C}$ током 24 сата проузроковало је формирање тамног талоба. Талог је сакупљен филтрирањем, испран хладном водом, хладним ацетоном и етром, и осушен под вакуумом. Одговарајући tpy комплекси **4** и **5** су синтетисани по сличном поступку користећи $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ (**P2**) као полазни комплекс.

[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl (1_{Cl}). (252) 100,0 mg (0,210 mmol) **P1** прекурсора, 16,8 μ L (0,252 mmol) en, 89,0 mg (2,100 mmol) LiCl и 87,9 μ L (0,630 mmol) Et₃N је додато у 20 ml смеше етанол/H₂O (3:1), при чему долази до формирања тамно љубичастог талоба комплекса **1**. Принос: 70,6 mg (67%). Израчунато за C₁₇H₁₈Cl₃N₅Ru (499,79): C, 40,9; H, 3,63; N, 14,01. Нађено: C, 40,8; H, 3,71; N, 13,92. Комплекс **1** је растворан у води, метанола и етанолу, слабо растворан у ацетону и нитрометану, док је нерастворан у хлороформу и дихлорметану. ¹H NMR (D₂O): 8,92 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz, C6H/C6''H), 8,42 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,35 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, C3H/C3''H), 7,99 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz, C4H/C4''H), 7,71 (ddd, 2H, *J* = 7,4, 5,6, 1,3 Hz, C5H/C5''H), 5,71 (t br, 2H, *J* = 5,1 Hz, NH₂ en), 3,25 (m br, 2H, CH₂ en), 2,69 (s br, 2H, NH₂ en), 2,36 (m br, 2H, CH₂ en). ¹H NMR (CD₃NO₂): 8,95 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz, C6H/C6''H), 8,42 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, C3H/C3''H), 8,38 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,06 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, C4H/C4''H), 7,73 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz, C5H/C5''H), 5,34 (s br, 2H, NH₂ en), 3,48 (m br, 2H, CH₂ en), 2,62 (m br, 2H, CH₂ en), 2,02 (преклопљен са сигналом H₂O, NH₂ en). ¹³C NMR (CD₃NO₂): 162,4 (C2'/C6'), 160,8 (C2/C2''), 153,6 (C6H/C6''H), 137,6 (C4H/C4''H), 136,7 (C4'), 128,7 (C5H/C5''H), 124,4 (C3H/C3''H), 122,5 (C3'H/C5'H), 46,92 (CH₂ en), 46,91 (CH₂ en). IR (KBr, cm⁻¹): ν_{NH} 3256 (m); ν_{tpy} 3036 (m), 1599 (s), 1474 (m), 1423 (s), 1119 (s), 787 (s), 566 (w); ν_{Ru-Cl} 320 (m). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max}, nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 239 (24310), 277 (20993), 317 (29034), 370 (4375), 503 (4390), 562 (3830).

[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl (2_{Cl}). (252) 100,0 mg (0,210 mmol) **P1** прекурсора, 30,3 μ L (0,252 mmol) dach, 89,0 mg (2,100 mmol) LiCl и 87,9 μ L (0,630 mmol) Et₃N је додато у 20 ml смеше етанол/H₂O (3:1), проузрокујући формирање тамно љубичастог талоба комплекса **2**. Принос: 80,2 mg (69%). Израчунато за C₂₁H₂₄Cl₃N₅Ru (553,88): C, 45,5; H, 4,37; N, 12,64. Нађено: C, 45,4; H, 4,29; N, 12,72. Комплекс **2** је растворан у води, метанола и етанолу, делимично растворан у нитрометану, док је нерастворан у ацетону, хлороформу и дихлорметану. ¹H NMR (D₂O): 8,98 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, C6H), 8,89 (d, 1H, *J* = 5,2 Hz, C6''H), 8,45 (s, 1H, C3'H), 8,44 (s, 1H, C5'H), 8,37 (t, 2H, *J* = 6,5 Hz, C3H/C3''H), 8,01 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, C4H/C4''H), 7,71 (t, 2H, *J* = 6,1 Hz, C5H/C5''H), 6,05 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, NH dach), 5,19 (m, 1H, NH dach), 2,76 – 2,61 (m, 2H, NH + CH dach), 2,61 – 2,51 (m, 1H, CH dach), 2,37 (m, 1H, NH dach), 2,09 – 1,97 (m, 1H, CH dach), 1,83 – 1,69 (m, 2H, CH dach), 1,55 (d, 2H, *J* = 10,1 Hz, CH dach), 1,24 (m, 1H, CH dach), 1,11 (m, 1H, CH dach), 0,89 (m, 1H, CH dach). ¹H NMR (CD₃NO₂): 8,98 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, C6H), 8,93 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, C6''H), 8,42 (t, 2H, *J* = 8,9 Hz, C3H/C3''H), 8,37 (dd, 2H, *J* = 10,7, 1,7 Hz,

$C3'H/C5'H$), 8,05 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, $C4H/C4''H$), 7,72 (m br, 2H, $C5H/C5''H$), 5,68 (d br, 1H, NH dach), 4,85 (t, 1H, $J = 12,2$ Hz, NH dach), 2,94 (m, 1H, CH dach), 2,69 (d br, 1H, CH_2 dach), 2,31 (m, 1H, CH dach), 2,11 (преклопљен са сигналом H_2O , NH dach), 1,92 – 1,79 (m, 2H, CH_2 dach), 1,74 (br m, 1H, NH dach), 1,68 (d br, 1H, $J = 13,1$ Hz, CH_2 dach), 1,59 (d br, 1H, $J = 12,7$ Hz, CH_2 dach), 1,34 (m, 1H, CH_2 dach), 1,21 (m, 1H, CH_2 dach), 1,01 (ddd, 2H, $J = 24,9, 12,5, 3,5$ Hz, CH_2 dach). ^{13}C NMR (CD_3NO_2): 162,44 ($C2'$), 162,37 ($C6'$), 160,8 ($C2$), 160,7 ($C2''$), 153,7 ($6''H$), 153,6 ($C6H$), 137,6 ($C4H$), 137,5 ($C4''H$), 137,0 ($C4'$), 128,9 ($C5''H$), 128,6 ($C5H$), 124,4 ($C3H$), 124,3 ($C3''H$), 122,54 ($C3'H$), 122,48 ($C5'H$), 61,9 (CH dach), 61,7 (CH dach), 36,4 (CH_2 dach), 35,1 (CH_2 dach), 25,7 (CH_2 dach), 25,3 (CH_2 dach). IR (KBr, cm^{-1}): ν_{NH} 3285 (m); ν_{tpy} 2930 (m), 1602 (s), 1472 (m), 1423 (m), 1109 (s), 785 (s), 563 (w); ν_{Ru-Cl} 310 (w). UV/Vis спектар (H_2O ; λ_{max} , nm (ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$)): 239 (24530), 278 (21080), 317 (29220), 369 (4430), 502 (4690), 561 (4010).

[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl]Cl (3_{Cl}). (252) 50,0 mg (0,105 mmol) **P1** прекурсора, 19,7 mg (0,126 mmol) bpy, 44,5 mg (1,050 mmol) LiCl и 43,9 μ l (0,315 mmol) Et₃N је додато у 10 ml смеше етанол/ H_2O (3:1), проузрокујући тамно црвени кристални талог комплекса **3**. Принос: 48,8 mg (78%). Израчунато за $C_{25}H_{18}Cl_3N_5Ru$ (595,87): C, 50,4; H, 3,04; N, 11,75. Нађено: C, 50,4; H, 3,13; N, 11,71. Погодни кристали за рендгенску структурну анализу добијени су из воденог раствора **3_{Cl}** додатком вишка NaCl. Комплекс **3** је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и нитрометану. 1H NMR (D_2O): 9,95 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz, CaH), 8,67 (s, 2H, $C3'H/C5'H$), 8,66 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, CdH), 8,41 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, $C3H/C3''H$), 8,36 – 8,29 (m, 2H, CgH/CcH), 7,99 (t, 1H, $J = 6,4$ Hz, CbH), 7,93 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, $C4H/C4''H$), 7,79 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, $C6H/C6''H$), 7,70 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, ChH), 7,38 – 7,29 (m, 3H, $CjH/C5H/C5''H$), 6,95 (t, 1H, $J = 6,7$ Hz, CiH). ^{13}C NMR (D_2O): 158,9 ($C2'/C6'$), 158,6 (Cf), 157,6 ($C2/C2''$), 156,1 (Ce), 152,5 ($C6H/C6''H$), 151,8 (CjH), 151,8 (CaH), 141,8 ($C4'$), 137,5 ($C4H/C4''H$), 137,0 (CcH), 135,9 (ChH), 127,7 ($C5H/C5''H$), 126,9 (CbH), 125,8 (CiH), 124,1 ($C3H/C3''H$), 123,4 (CdH), 123,1 (CgH), 123,0 ($C3'H/C5'H$). IR (KBr, cm^{-1}): ν_{tpy} 3043 (m), 1600 (m), 1463 (m), 1421 (s), 1117 (s), 788 (s), 568 (m); ν_{Ru-Cl} 351 (w). UV/Vis спектар (H_2O ; λ_{max} , nm (ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$)): 239 (19670), 281 (19500), 290 (19240), 313 (18090), 488 (5810).

[Ru(Cl-tpy)(pic)Cl] (4_{Cl}). (253) 50,0 mg (0,105 mmol) **P1** прекурсора, 20,3 mg (0,126 mmol) bpy, 44,5 mg (1,050 mmol) LiCl и 43,9 μ l (0,315 mmol) Et₃N је додато у 10 ml смеше етанол/ H_2O (3:1), проузрокујући формирање тамно љубичастог талоба комплекса **4**. Принос: 40,3 mg (73 %). Израчунато за $C_{21}H_{14}Cl_2N_4O_2Ru$ (526,34): C, 47,9;

H, 2,68; N, 10,64 %. Нађено: C, 47,9; H, 2,71; N, 10,62 %. Комплекс **4** је растворан у дихлорметану, нитрометану и ацетонитрилу, делимично растворан у води и метанолу, док је нерастворан у етанолу, ацетону и хлороформу. ^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{D}_2\text{O}$ (6:1)): 8,68 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,64 (d, 2H, $J = 4,8$ Hz, C6H/C6''H), 8,62 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, C3H/C3''H), 8,04 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, C4H/C4''H), 8,02 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, C3H pic), 7,70 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, C5H/C5''H), 7,68 (t, 1H $J = 7,5$ Hz, C4H pic), 7,06 (d, 1H, $J = 5,0$ Hz, C6H pic), 6,95 (t, 1H $J = 7,5$ Hz, C5Hpic). ^1H NMR (CD_3CN): 8,53 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, C6H/C6''H), 8,44 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,35 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, C3H/C3''H), 7,95 – 7,87 (m, 3H, C4H/C4''H/ C3H pic), 7,55 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, C5H/C5''H), 7,50 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, C4Hpic), 6,79 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz, C5H pic), 6,76 (d, 1H, $J = 4,7$ Hz, C6H pic). ^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{D}_2\text{O}$ (6:1)): 159,5 (C2'/C6'), 158,1 (C2/C2''), 152,0 (C6H/C6''H), 151,5 (C6H pic), 137,1 (C4H/C4''H), 136,6 (C4'), 136,1 (C4H pic), 128,4 (C5H/C5''H), 128,1 (C5H pic), 127,1 (C3H pic), 123,9 (C3H/C3''H), 122,6 (C3'H/C5'H). IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{терп}}$ 2918 (m), 2850 (m), 1596 (s), 1473 (w), 1423 (w), 1112 (s), 794 (m), 566 (w); $\nu_{\text{asym(COO)}}$ 1630 (vs); $\nu_{\text{sym(COO)}}$ 1343 (s). UV/Vis спектар (CH_3CN ; λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 240 (51690), 280 (37157), 315 (49133), 369 (13253), 510 (12480).

3.1.3. Синтеза $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}_3]$ комплекса ($\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}} = 2,6\text{-бис(5-терц-бутил-1H-пирозол-3-ил)пиридин}$)

$[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}_3]$ (**5**). 100,0 mg $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,38 mmol) је растворено у 46,0 ml етанола и раствор је рефлукуван све док се боја не промени из браон у зелену (око 2 сата). Затим је додато $\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}}$ 123,7 mg $\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}}$ (0,38 mmol) и настављено рефлукување још 4 сата. Током рефлукувања боја раствора је промењена у жуто-браон са истовременим формирањем зеленог талоба. Након хлађења раствора на собној температури, талог је сакупљен филтрирањем, испран етанолом и етром и осушен под вакумом. Принос: 150,0 mg (74%). Израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{Cl}_3\text{N}_5\text{Ru}$ (530,86): C, 42,99; H, 4,75; N, 13,19. Нађено: C, 42,88; H, 4,80; N, 13,12. Комплекс **5** је растворан у ацетону, DMSO-у и ацетонитрилу, делимично растворан у метанолу, етанолу, хлороформу и дихлорметану, док је нерастворан у води. IR (KBr, cm^{-1}): ν_{NH} 3497 (s), $\nu_{\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}}}$ 2970 (m), 2936 (m), 1609 (w), 1480 (m), 1461 (s), 1301 (s), 808 (s). UV/Vis спектар (MeOH; λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 224 (23610), 255 (16049), 305 (18838), 380 (11810), 438 (8892).

3.2. Мерења

3.2.1. Елементална анализа

Елементална микроанализа (C, H, N) новосинтетисаних комплекса рађена је у Департману за хемијске науке и технологију, Универзитета у Удинама, Италија.

3.2.2. UV-Vis спектрофотометријска анализа

UV-Vis спектри снимани су помоћу Perkin Elmer Lambda 35 и Perkin Elmer Lambda 25 спектофотометра са термостатираном 1,00 cm кварцном Suprasil киветом (3,0 ml) на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

3.2.3. IR спектроскопска анализа

Инфрацрвени спектри новосинтетисаних комплекса снимани су помоћу спектрометра Perkin-Elmer FTIR 31725 (КВг техника) на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

3.2.4. NMR спектроскопска анализа

Моно-димензионални (^1H (200, 400 или 500 MHz), ^{13}C (100,5 или 126 MHz), ^{31}P (202 MHz)) и би-димензионални (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC) NMR спектри снимани су на Varian Gemini-200, JEOL Eclipse 400FT и Varian 500 спектрометру. ^1H хемијска померања у D_2O су дата у односу на интерни стандард 2,2-диметил-2,2-силапентан-5-сулфонат (DSS) на $\delta = 0,00$ ppm, у појединим случајевима у односу на натријум-триметилсилилпропан-3-сулфат (TSP) или у односу на додати 1,4-диоксан ($\delta = 3,75$ ppm). У другим растварачима, хемијска померања су дата у односу на резидуални пик недеутерисаног растварача [$\delta = 4,33$ ppm за CD_3NO_2 , 2,05 ppm за $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, и 2,50 ppm за диметил сулфоксид (DMSO)- d^6]. ^{13}C хемијска померања у D_2O су дата у односу на екстерне раствараче ($\delta = 17,5$ и 58,1 ppm за етанол, 39,4 ppm за DMSO), док су у другим растварачима дати у односу на резидуални пик недеутерисаног растварача ($\delta = 62,8$ ppm за CD_3NO_2 ; 29,84 ppm за $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 39,52 ppm за DMSO- d^6). Сви спектри су снимани на 298 K, а добијени резултати су анализирани помоћу компјутерских програма Origin 8, Microsoft Excel 2007 и MestReNova.

3.2.5. Рендгенска структурна анализа

Рендгенска структурна испитивања за кристал $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**3**) су вршена на дифракционој линији снопа X-зрака синхротрона Elettra (Трст) на 100 К, $\lambda = 0,7000$ и $0,88560$ Å. Рендгенска структурна анализа $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**3**) комплекса је урађена помоћу директних метода имплементираних у SIR92. (254) Утачњавање структуре је вршено коришћењем методе најмањих квадрата, F^2 , помоћу програма SHELXL-97. (255) Сви атоми, осим водоникових, су одређени анизотропно. Водоникови атоми су постављени на израчунатим позицијама и третирани употребом одговарајућих „riding” модела. За анализу добијених података и припрему слика коришћени су програми Mercury, ORTEP, Platon и Diamond Crystal. Кристалографски подаци за комплекс **3** су дати у Табели 10. се настављају

Комплекс	3
Емпиријска формула	$\text{C}_{50}\text{H}_{49}\text{Cl}_6\text{N}_{10}\text{O}_{6,50}\text{Ru}_2$
М	1308,83
Температура (К)	100(2)
Кристал	Моноклиничан
Просторна група	$P 2_1/c$
a (Å)	14,3440(9)
b (Å)	14,6880(10)
c (Å)	27,2930(14)
α (°)	90,0
β (°)	98,020(11)
γ (°)	90,0
Запремина, V (Å ³)	5694,0(6)
Z	4
$D_{\text{израчуната}}$ (g/cm ³)	1,527
Величина кристала (mm)	0,33 x 0,26 x 0,22
Боја	Жут
Сакупљени подаци	27961 / 14608
R_{int}	0,0477
Број ограничења / број параметара	0 / 715
F^2	1,079
R_1, wR_2 [$I > 2\sigma(I)$]	0,0599 / 0,1771
R_1, wR_2 (сви)	0,0680 / 0,1844
Највећи дифракц. пик (eÅ ⁻³)	4,017 / -1,643

Табела 10. Кристалографски подаци за комплекс **3**.

3.2.6 Кинетичка мерења

Кинетика реакција супституције комплекса **1** и **2** са L-хистидином изучавана је UV-Vis спектрофотометријски. Реакције су проучаване на три различите температуре (288, 298 и 310 K) у 25 mM Нерес пуферу (pH = 7,4) уз додатак 30 mM NaCl. Кинетика испитиваних реакција је праћена под условима реакције *pseudo*-првог реда (концентрација лиганда је била најмање 10 пута у вишку у односу на концентрацију комплекса). Супституционе реакције су започете мешањем 0,3 cm³ раствора комплекса (1,00 mM) са 2,7 cm³ раствора лиганда (4,45 mM).

Спектрофотометријско одређивање константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , врши се праћењем промене апсорбције раствора A_t са временом t на одређеној таласној дужини, (256) на основу једначине (1).

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obsd}} t \quad (1)$$

Зависност $\ln(A_t - A_\infty)$ од времена t је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за k_{obsd} . Величина A_∞ представља апсорбцију раствора након „бесконечно” дугог времена. (257) Добијена вредност за константу брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , представља средњу вредност 2 до 3 независних кинетичких мерења. За обраду података коришћени су компјутерски програми Microsoft Excel 2007 и Origin 8.

3.2.7. Квантно хемијска метода

B3LYP/LANL2DZp, хибридна теорија функционала густине, са псеудо-потенцијалом примењена је на метал. (258, 259) Током оптимизације структура само се симетрија узимала као константа. Поред тога, добијене структуре су окарактерисане израчунавањем вибрационих фреквенција. Релативне енергије су кориговане за нулту тачку вибрационих енергија (ZPE). За израчунавања коришћен је GAUSSIAN 09 пакет програма. (260) Утицај растварача коригован је коришћењем „single-point calculations” метода а уз помоћ CPCM формализма тј. B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp.

3.2.8. Липофилност

Log $P_{o/w}$ представља коефицијент расподеле између октанола и воде, а одређује се помоћу "flask-shaking" методе. Аликвоти раствора комплекса **1** – **3** у 100 mM раствору

NaCl zasiћеног октанола (како би се спречила хидролиза комплекса) додати су у исту запремину октанола (засићен са 0,9 % NaCl w/v). Смеша је мешана на 60 rpm на 298 K, како би дошло до раздвајања. Након стајања 24 h у левку за одвајање, водени слој је пажљиво одвојен од октанола и коришћен је за одређивање концентрације рутенијума. Концентрација рутенијума у воденој фази одређена је помоћу UV-Vis спектрофотометрије, а коришћена је за израчунавање односа $[Ru]_o/[Ru]_w$.

3.3. Интеракције комплекса са ДНК

3.3.1. Абсорпциона спектроскопска испитивања

Интеракције комплекса **1** и **2** са ДНК су проучаване помоћу UV спектрофотометрије, у циљу одређивања могућег начина везивања за ДНК и израчунавања константи везивања (K_b). Експерименти су извођени на 37 °C. Tris-HCl пуфер је коришћен за абсорпциона мерења. Серије раствора комплекс–ДНК су припремљене мешајући раствор комплекса константне концентрације (12,5 μ M) са инкрементима ДНК раствора концентрације 2,00 mM.

3.3.2. Флуоресцентна испитивања

Интеракције комплекса за ДНК су такође испитиване и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације 527 nm, и флуоресцентне емисије на 612 nm. Ширина ексцитационог и емисионог прореза (10 nm) као и брзина снимања су константне за све експерименте. Полазни раствори ДНК (2,0 mM) и комплекса (0,1 mM) су припремљени у 10 mM Tris-HCl пуферу (pH = 7,4, 150 mM NaCl). Серија раствора комплекс–ДНК је припремљена мешајући раствор ДНК са различитим концентрацијама раствора комплекса. За одређивање флуоресценције концентрација ДНК је 80,0 μ M, а концентрација комплекса је варијала од 8,0 μ M до 80,0 μ M. Пре мерења, систем је инкубиран на собној температури у току 5 min. Емисија раствора је снимана у области од 550 до 750 nm.

3.3.3. Мерење вискозитета

Вискозност ДНК раствора је мерена у присуству растуће концентрације комплекса **1** и **2**. Време протока је мерено помоћу дигиталне штоперице, сваки узорак је мерен три пута, а затим је израчуната средња вредност. Подаци су представњени као

зависнот $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ од r , где је η вискозност ДНК раствора у присуству комплекса, а η_0 је вискозност само ДНК у раствору пуфера. Вредности вискозитета израчунате су тако што се добијене вредности за време протока ДНК раствора (t) коригују помоћу вредности за време протока раствора који садржи само пуфер (t_0), $\eta = (t-t_0)/t_0$.

3.4. Биолошка мерења

3.4.1. Ћелијске културе

Ћелијска линија мишјег карцинома колона СТ26 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CRL-2638), добијена је из карцинома колона индукованог код BALB/C миша применом N-нитрозо-N-метилуретана. Користи се као анимални модел за тестирање терапијских протокола за карцином колона. Овим ћелијама је могуће изазвати ортотопски модел карцинома колона, хетеротопски модел субкутаном инјекцијом и метастатски модел интравенском инјекцијом у латералну репну вену. Након интравенске инјекције СТ26 дају метастазе у плућима.

За иницијална *in vitro* испитивања су поред СТ26 линије коришћене и ћелијска линија хуманог карцинома плућа А549 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CCL-185) и хуманог колоректалног карцинома НСТ116 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CCL-247).

Туморске ћелије СТ26 су култивисане у комплетном DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagles Medium) са 10% феталног телећег серума (FBS, енгл. Fetal Bovine Serum), 2mmol/l L-глутамин (L-glutamine), 100U/mL пеницилина, 100 μ g/mL стрептомицина и 1mmol/l мешаних неесенцијалних аминокиселина (Sigma–Aldrich, Munich, Germany). Малигне ћелије су узгајане у асептичним условима у инкубатору на 37°C са 5% CO₂.

Непосредно пре *in vivo* и *in vitro* експеримената, субконфлуентне СТ26 ћелије (~80%), у логаритамској фази раста, одвајне су са дна флашка (BD Falcon) краткотрајним третирањем раствором 0,25% трипсина и 0,02% EDTA (енгл. ethylenediaminetetraacetic acid) (PAA Laboratories GmbH) раствореног у PBS-у (енгл. Phosphate Buffered Salline, PAA Laboratories GmbH) у трајању од 1 минута. Ћелије су затим опране у комплетном медијуму са додатком 10% FBS-а, да би FBS инактивисао

трипсин и спречио оштећење ћелија, а затим центрифугиране на 125 x g 10 минута. Вијабилност ћелија је одређена виталним бојењем трипан плавим (енгл. trypan-blue). Трипан плаво је боја која има могућност дифундовања искључиво у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док ћелије са интактном ћелијском мембраном остају необојене. Само она ћелијска суспензија која садржи више од 95% вијабилних ћелија је коришћена у експериментима.

3.4.2. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест

МТТ тест је метода којом се индиректно одређује вијабилност ћелија. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma–Aldrich, Munich, Germany), је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама со тетразолијум бромида се редукује до љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења (МТТ) до формазана, директно пропорционална броју живих ћелија. Кристали формазана растворљиви су у DMSO-у (енгл. *Dimethyl sulfoxide*) што омогућава спектрофотометријску квантификацију интензитета љубичасте боје на таласној дужини од 595 nm. Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци.

Малигне ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка на претходно описан начин и број је одређен коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија тј ћелија обојених трипан плавим. Након што је припремљена ћелијска суспензија густине 3×10^4 ћелија/ml, у микротитар плоче са 96 бунара сипано је по 100 μ l ћелијске суспензије (3000 ћелија по бунару). Након инкубације од 24 часа у стандардним условима, медијум је одливен а малигне ћелије су излагане комплексима рутенијума, у концентрацијском распону од 3,9 μ M до 500 μ M (укупна запремина сваког бунара била је 100 μ l) у различитим временским периодима (24 или 72 часа). По истеку 24 и 72 часа третирања туморских ћелија супстанцом течност из свих бунара микротитар плоча је одливена и у сваки бунара додати по 100 μ l медијума са 20 % МТТ раствора (5mg/ml у PBS-у). Плоче су инкубирани наредна 4 часа под стандардним условима. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки

отвор је сипано по 150µl DMSO-а (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 µl глицинског пуфера (pH-10,5) Оптичка густина (OD) одређена је на таласној дужини од 595 nm, на *Microplate multimode detector Zenyth 3100*.

Вијабилност ћелија је израчуната помоћу формуле 1:

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E-B)/(K-B) \times 100 \quad (1)$$

Е-ћелије третиране испитиваном супстанцом (апсорбанца); Б- контрола-бленк (апсорбанца); К- нетретиране ћелије (апсорбанца).

Вредности апсорбанце третираних ћелија су поређене са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија и на основу тога је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија услед дејства комплекса рутенијума. Вијабилност ћелија приликом третмана је испитивана у трипликату и у три независна експеримента.

3.4.3. Кванитативно испитивање апоптотске смрти *Annexin V-FITC* тестом апоптотичности

Апоптоза је тип ћелијске смрти који карактерише транслокација негативно наелектисаног трансмембранског фосфолипида, фосфатидил-серина, са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Иако је интегритет ћелијске мембране у раној фази апоптотичне смрти очуван већ тада долази до губитка асиметрије мембранских фосфолипида, фосфатидил-серин бива изложен на спољашњу страну ћелијске мембране. *Annexin V* је протеин који има способност везивања за калцијум, фосфолипиде и фосфатидил-серин. Међутим, у касним фазама апоптозе и у некротичном типу ћелијске смрти нарушава се интегритет ћелијске мембране, што омогућава појединим молекулима као што је пропидијум јодид (*PI* енгл. *propidium iodide*) везивање за ДНК присутну у ћелији. Због тога се може сматрати да су *Annexin V* (-); *PI* (-) ћелије живе, *Annexin V* (+); *PI* (-) ћелије су у раним фазама апоптозе, *Annexin V* (+); *PI* (+) су у касним фазама апоптозе а *Annexin V* (-); *PI* (+) некротичне ћелије.

У експоненцијалној фази раста малигне СТ26 ћелије су пресејане у нове флашкове. Када су ћелије достигле конфлуентност од 70%, медијум је замењен медијумом са додатком комплекса рутенијума у концентрацији 50 µM. Контролне ћелије нису излагане биолошки активном једињењу, и у овим флашковима медијум је замењен свежим

комплетним медијумом. Након 24 сата изложености ћелије су 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-FITC* (BD Pharmingen, San Diego, California, USA) и 5 µl *PI* (50 µg/ml PBS-a). После истека 15 минута инкубације на собној температури и у мраку, у сваки узорак је додато по 400 µl 1X пуфера за везивање. Анализирано је 20000 догађаја на *FACS Calibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (Tree Star).

3.4.4. Анализа ћелијског циклуса

За успешну анализу ћелијског циклуса неопходна је супстанца која је ДНК селективна а која може да означи ћелије по хомогеном обрасцу минимализирајући варијабилност флуоресценције. За анализу процентуалне заступљености СТ26 малигнућ ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса коришћен је *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* кит (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA). *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* се користи за анализу садржаја ДНК у живим ћелијама. Након што поменута боја лако пролађе кроз ћелијску мембрану и двоструко се веже за молекуле ДНК на основу интензитета флуоресценције може се одредити количина молекула ДНК у анализираним туморским ћелијама које се налазе у одређеној фази ћелијског циклуса. Након постизања конфлуентности у фласковима од 70-80%, СТ26 малигне ћелије третиране су комплексом рутенијума и лигандом, оксалиплатином као контролном супстанцом у концентрацијама од 50 µM, као и свежим медијумом (контрола) у периоду од 24 часа при стандардним условима. Након истека инкубације, малигне ћелије су опране у комплетном медијуму. Ћелије су након тога ресуспендоване до густине ћелијске суспензије од 5×10^5 ћелија/ml. За даљу анализу неопходно је одмерити 0,5ml ћелијске суспензије у коју је додат 1µl *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* боје. Узорци су након тога инкубирани 30 минуа на температури од 37°C, ван домашаја светлости. Анализа је извршена помоћу проточног цитометра *FACS Calibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (Tree Star).

3.4.5. Мерење експресије Noxa и Ki-67 молекула у туморским ћелијама проточном цитометријом

Експресија маркера пролиферације Ki-67 и антиапоптозног протеина Noxa одређивана је проточном цитометријом у СТ26 ћелијама третираним комплексом рутенијума, лигандом и оксалиплатином у концентрацији 50 μM у периоду од 24 часа. Након инкубационог периода од 24 часа у присуству испитиваних једињења или чистог медијума (контрола) СТ26 малигне ћелије су опране хладним PBS-ом и ресуспендоване у комплетном медијуму тако да густина ћелијских суспензија буде $2 \times 10^6/\text{ml}$. Малигне ћелије су затим фиксиране и пермеабилисане (Fixation and Permeabilization Kit, BD Bioscience). Након инкубације од 20 минута на температури од 4°C , ћелије су опране у BD Perm/Wash™ Buffer-у (BD Bioscience) и центрифугиране на $125 \times g$ 10 минута. Супернатан је одливан, а СТ26 ћелије су инкубирани са примарним антителима која су већ обележена флуорохромом (FITC), претходно третиране као и нетретиране 4T1 ћелије су инкубирани у присуству поменутих антитела 20 минута на температури од 4°C . Након тога ћелије су опране у BD Perm/Wash™ Buffer-у (BD Bioscience), центрифугиране и ресуспендоване у 250 μl пуфера за бојење. Други начин бојења подразумевао је да третиране и нетретиране 4T1 ћелије буду инкубирани 20 минута на температури од 4°C уз додатак примарног антитела за циклин D3 (ab28283, Abcam Cambridge, United Kingdom). Ћелије су након истека инкубације, опране на исти начин и додатно инкубирани под истим условима у присуству секундарног антитела (goat anti-mouse IgG FITC (ab6785 Abcam Cambridge, United Kingdom)). Након поновног центрифугирања, ћелијски талог је ресуспендован у 250 μl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA). Подаци су анализирани помоћу FlowJo програма (Tree Star).

3.5. Методе за испитивање антитуморске активности комплекса рутенијума *in vivo*

3.5.1. Експерименталне животиње

Истраживања су спроведена мишевима чистог соја BALB/C старости од 8 до 12 недеља. У испитивања су укључене животиње усклађене старости и телесне масе, као и пола, између експерименталних група.

Мишеви су одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Животиње су чуване према прописаним узгојним условима (храна и вода за пиће *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла). Спроведено истраживање одобрила је Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-10873 од 22.10.2015. године.

3.5.2. Експериментални модел карцинома колона

Хетеротопски модел карцинома колона индукован је субкутаном применом 1×10^6 СТ26 ћелија у 50 μ l DMEM-а у дорзалну регију миша. Непосредно пре инокулације, вијабилност туморских ћелија је доређена бојењем трипан плавим и за апликацију је коришћена само она суспензија која садржи више од 95% вијабилних ћелија.

Од осмог дана након апликације туморских ћелија мишеви су примали комплекс рутенијума, лиганд и оксалиплатину. Суспенције су примењиване интраперитонеално у дози од 10 mg/kg, ресуспендовановано у 200 μ l физиолошког раствора (0,9% NaCl), три пута недељно у току три недеље.

Поред поменутих, у истраживању су постојале и три контролне групе и то: мишеви којима је апликован само комплекс рутенијума, мишеви којима је апликована само оксалиплатина и мишеви који су третирани лигандом. Испитиване супстанце су у овим групама апликоване истим ритмом као у претходно поменутих експерименталних групама.

Мишеви су жртвовани 4 недеље од примене апликације туморских ћелија.

Одређивање величине примарног тумора.

Раст примарног тумора праћен је свакодневно, регистрањем палпабилног тумора, а његова величина одређивана је морфометријски, коришћењем нониуса. Запремина тумора је израчунава по формули 2:

$$V(\text{mm})^3 = \frac{L (\text{највећи пречник}) \times W^2 (\text{најмањи пречник})}{2} \quad (2)$$

Хистопатолошка анализа метастаза

Мишеви соја BALB/C су жртвовани 28. дана експеримента, цервикалном дислокацијом. За хистопатолошку анализу коришћени су примарна туморска маса, плућа, јетра и мозак.

3.5.3. Израда патохистолошких препарата

Непосредно након изолације, ткива изолованих органа су фиксирана у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени резови дебљине 5 μm . За патохистолошку анализу су коришћени ткивни пресеци са пет нивоа на међусобном растојању од 25 μm (од сваког миша анализирано је по 5 ткивних исечака). Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

3.5.3.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Добијени парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56°C у трајању од 45 минута, и након тога су депарафинисани у ксилолу. Затим је урађен поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, након чега су испрани дестилованом, а потом текућом водом 5 минута. Након тога, препарати су трајању од два минута бојени препаратом еозина (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). После бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације употребљене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након дехидратације, препарати су просветљени потапањем у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1 у трајању од једног минута, а потом два пута по један минут у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након сушења у трајању од 24 сата, препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*BX51, Olympus, Japan*).

3.5.3.2. Верификација броја и величине метастатских колонија

Метастатске колоније су верификоване у плућима и јетри BALB/С мишева.

У овој студији су семиквантитативно одређивани просечан број метастаза по мишу, као и величина метастатских колонија и то одређивањем процента метастатског подручја у плућима или јетри. Одређивање процентуалне заступљености метастатских колонија вршено је употребом *Image J* софтвера. Добијени резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка.

3.5.4. *In situ* детекција фрагментације ДНК

За бојење TUNEL методом коришћени су парафински исечци туморског ткива дебљине 5 μm , на којима је урађен поступак депарафинизације и рехидратације ткива. Након завршеног поступка депарафинизације ткивни исечци су потопљени у расхлађени ацетон 8 минута, а након тога испрани 2 пута по 5 минута у PBS-у. На сваки ткивни исечак је затим нането по 50 μL мешавине за TUNEL реакцију (450 μL *Label solution*, 50 μL *enzyme solution*), и након инкубације од 60 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку, препарати су 3 пута по 5 минута испирани у PBS-у. На ткивне исечке је затим нането по 50 μL POD конвертера, и ткивни исечци су инкубирани 30 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку. Након инкубације препарати су 3 пута по 5 минута испирани у PBS-у, и на сваки препарат је нането 50-100 μL DAB супстрата и инкубирани су 10 минута на собној температури. После троструког испирања у PBS-у, на обојене ткивне исечке је нанета по једна кап глицерола и прекривени су покровном лъуспицом.

3.5.5. Изолација мононуклеарних ћелија из слезине

Екстирпирана слезина је хомогенизована клипом шприца, а затим пропуштена 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-a). Добијени садржај је пребачен у епрувету од 15 ml и центрифугиран на 1500 rpm 5 минута. Супернатант је одливен, а ћелијски талог је ресуспендован у 5 ml *lysing* раствора у циљу лизирања еритроцита и инкубиран 5 минута на +4°C. Након истека инкубације, додавањем 5 ml RPMI-1640 медијума са додатком 10% FBS-a је заустављено даље лизирање. Добијена суспензија је поново центрифугирана, супернатант одливен, а пелет ресуспендован у 8 ml RPMI-1640 медијума са додатком 10% FBS-a. Ћелије су још

једном пропуштене кроз ћелијско сито како би се избегла контаминација спленочита хистиоцитима слезине. На овај начин је добијена суспензија спленочита, која је коришћена у даљим испитивањима.

3.5.6. Анализа популација мононуклеарних ћелија слезине методом проточне цитометрије

Мононуклеарне ћелије су изоловане слезине и приликом бројања ћелија, одређивана је вијабилност методом бојењем *trypan-blue* бојом. У експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%. Методом проточне цитометрије анализирана је процентуална заступљеност различитих популација мононуклеарних ћелија.

У циљу дефинисања различитих субпопулација мононуклеарних ћелија изолованих из слезине коришћена су анти-мишја моноклонска антитела специфична за различите мембранске и интрацелуларне молекуле, обележена различитим флуоресцентним бојама. У свакој анализи коришћено је 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; *BD Biosciences*). Ћелијама је додата одговарајућа количина моноклонских антитела примарно обележених различитим флуоресцентним бојама у одређеним комбинацијама. Испитиване мононуклеарне суспензије су инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама. Сва антитела коришћена за површинско бојење, као и изотипске контроле, коришћена су у концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији буду 1:200. Талог ћелија са антителима краткотрајно је вортексован и онда инкубиран у мраку на температури од +4°C 20 минута. По истеку инкубације, ћелије су "опране" додавањем 1,5ml хладног пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, *BD*). Након тога, ћелије су центрифугиране 5 минута на 400G. После центрифугирања одливен је супренатант и талог ћелија ресуспендован у 350 μ l пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру FACSCalibur (BD). За цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. *Gate*) мононуклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* (*Tree Star Ashland, OR, USA*) софтвера.

3.5.7. Испитивање потенцијално токсичних ефеката комплекса рутенијума

Мишеви експерименталних и контролних група су жртвовани цервикалном транслокацијом и узета им је крв из трбушне аорте која је центрифугирана 20 минута/12000 обртаја/4°C. Серум је издвојен за сваког појединачног миша ради одређивања концентрације трансминаза: аспартат трансминазе (AST) и аланин трансминазе (ALT) као и концентрације урее и серумског креатинина. Концентрације трансминаза, урее и серумског креатинина су измерене коришћењем специфичних колориметријских китова: mouse AST ELISA кита, mouse ALT ELISA кита (Elabscience), Urea Assay кита (Abcam) и Creatinine ELISA кита (BioSciences) .

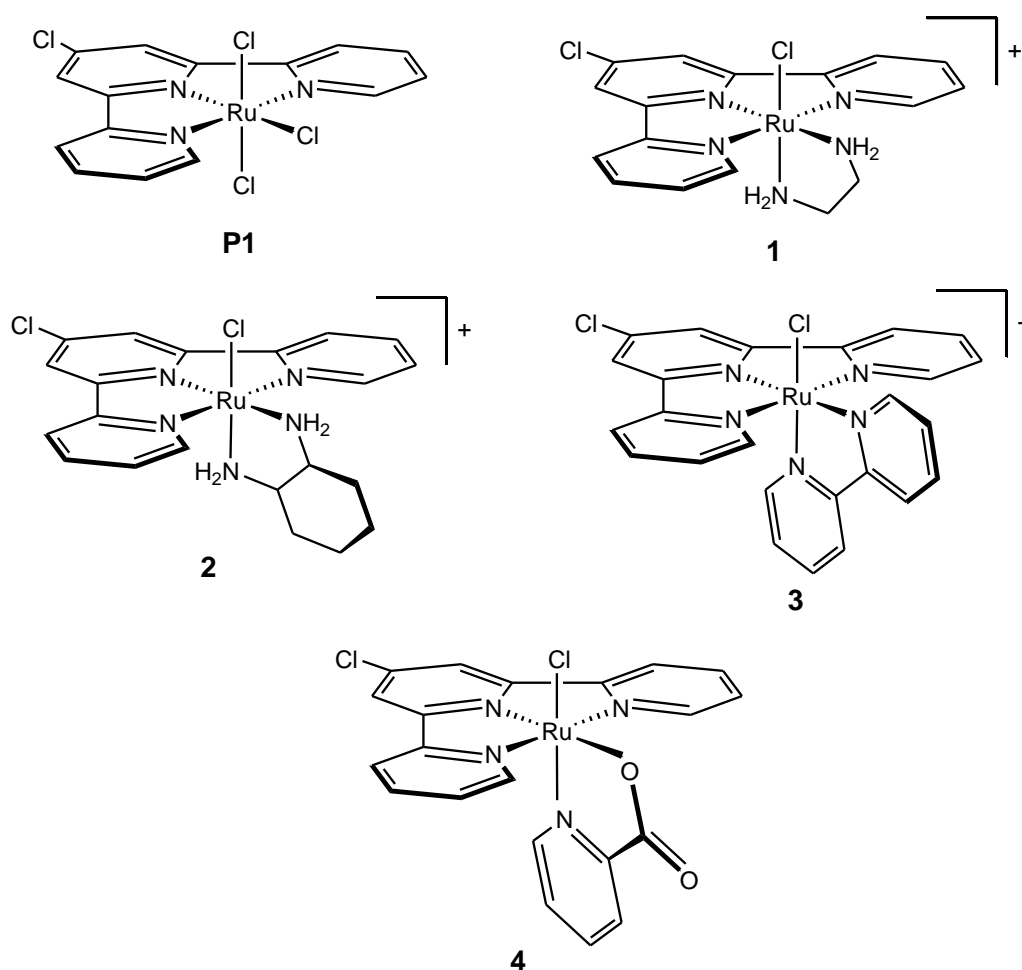
3.6. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, испитана је правилност расподеле добијених вредности користећи *Kolmogorov-Smirnov* тест. Уколико су вредности имале правилну расподелу коришћен је параметарски *Student's t* тест, док се неправилна расподела поредила коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* теста. Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација (SD) или стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,01$.

4. РЕЗУЛТАТИ

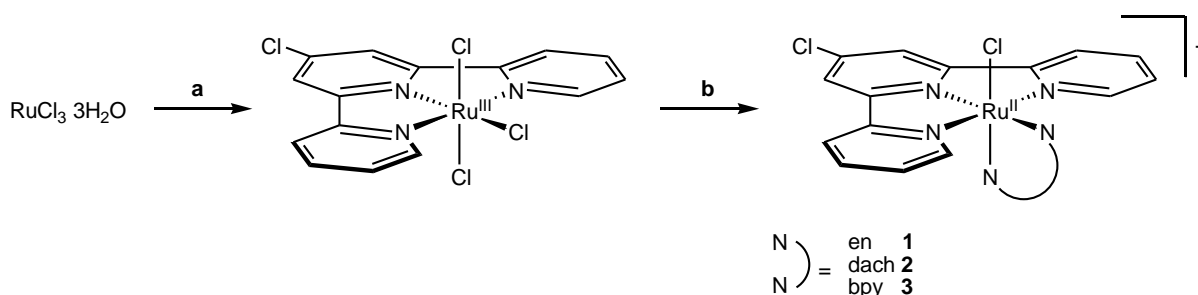
4.1. Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса

Синтетисана је серија рутенијум(II) комплекса опште формуле $mer-[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]Cl$, где је Cl-tpy = 4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин, N-N је бидентатни хелатни лиганд етилендиамин (en, **1**), 1,2-диаминоциклохексан (dach, **2**) или 2,2'-бипиридин (bpy, **3**) (Слика 15). (252) С обзиром да су сва три синтетисана комплекса катјонска, да би испитали понашање неутралног комплекса, у оквиру ове Докторске дисертације синтетисали смо Ru(Cl-tpy) комплекс са ањонским N-O бидентатним лигандом пиколином, $[Ru(Cl-tpy)(pic)Cl]$ (pic = пиколин, **4**) (Слика 15). (253)



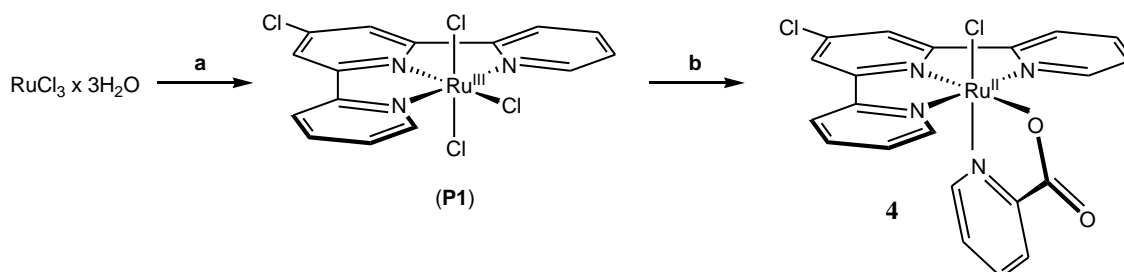
Слика 15. Структурне формуле рутенијум(II) терпиридин комплекса **1** – **4**.

Катјонски рутенијум(II) комплекси $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]\text{Cl}$ [$\text{N-N} = \text{en}$ (**1**), dach (**2**) и bpy (**3**)] су синтетисани у веома добрим приносима полазећи од неутралног рутенијум(III) прекурсора $\text{mer-}[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})\text{Cl}_3]$ у реакцијама са неутралним N-N хелатним лигандом, као што су en , dach или bpy , у присуству Et_3N као редукционог средства и вишка LiCl , који је потребан како би се спречила дисоцијација Cl^- из финалног производа као и због њиховог таложења (Шема 10). (252)



Шема 10. Путеви за синтезу комплекса **1-3**. Реагенси и услови: (а) Cl-tpy (0,9 eq), EtOH , рефлуктовање; (б) N-N (1,2 eq; $\text{N-N} = \text{en}$, dach или bpy), етанол/вода (3:1), Et_3N (3,0 eq), LiCl (10,0 eq), рефлуктовање

Као што смо већ напоменули, за разлику од катјонских комплекса **1 – 3**, у оквиру ове Докторске дисертације синтетисан је и окарактерисан неутрални комплекс $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$ ($\text{pic} = \text{пиколин}$, **4**), ради поређења хемијског понашања и његове биолошке активности. (253) Комплекс **4** је синтетисан у веома добром приносу на сличан начин као и комплекси **1 – 3**, уз коришћење одговарајућег анјонског N-O хелатног лиганда, пиколина (pic) (Шема 11).



Шема 11. Синтетички пут за синтезу комплекса **4**. Реагенси и услови: (а) Cl-tpy (0,9 eq.), EtOH , рефлуктовање; (б) N-O (1,2 eq; pic), етанол/ H_2O (3:1), Et_3N (3,0 eq.), LiCl (10,0 eq.), рефлуктовање.

4.1.1. Елементална микроанализа рутенијум(II) терпиридин комплекса

У Табели 11, 12, 13 и 14 су приказани резултати елементалне микроанализе за комплексе **1** – **4**. На основу добијених података може се закључити одлично слагање између израчунатих и нађених вредности за испитиване комплексе.

Табела 11. Резултати микроанализе $[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl$ (**1**).

Mr (C ₁₇ H ₁₈ Cl ₃ N ₅ Ru) = 499,79	C(%)	N(%)	H(%)
Израчунато	40,9	14,01	3,63
Нађено	40,8	13,92	3,71

Табела 12. Резултати микроанализе $[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl$ (**2**).

Mr (C ₂₁ H ₂₄ Cl ₃ N ₅ Ru) = 553,88	C(%)	N(%)	H(%)
Израчунато	45,5	12,64	4,37
Нађено	45,4	12,72	4,29

Табела 13. Резултати микроанализе $[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl]Cl$ (**3**).

Mr (C ₂₅ H ₁₈ Cl ₃ N ₅ Ru) = 595,87	C(%)	N(%)	H(%)
Израчунато	50,4	11,75	3,04
Нађено	50,4	11,71	3,13

Табела 14. Резултати микроанализе $[Ru(Cl-tpy)(pic)Cl]Cl$ (**4**).

Mr (C ₂₁ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ O ₂ Ru) = 526,34	C(%)	N(%)	H(%)
Израчунато	47,9	10,64	2,68
Нађено	47,9	10,62	2,71

4.1.2. Електронски апсорбциони спектри рутенијум(II) терпиридин комплекса

Електронски апсорбциони спектри рутенијум(II) комплекса **1** – **4** имају неколико интензивних апсорбционих максимума у ултраљубичастој области ($200 < \lambda < 330$ nm), који припадају $\pi \rightarrow \pi^*$ прелазима лиганата. Такође, постоје и широки интензивни апсорбциони максимуми у видљивој области, који припадају метал-лиганд $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$ (полипиридил) прелазима. (261) Ово указује на координацију лиганата за јон рутенијума и формирање одговарајућих комплекса.

4.1.3. Инфрацрвени спектри рутенијум(II) терпиридин комплекса

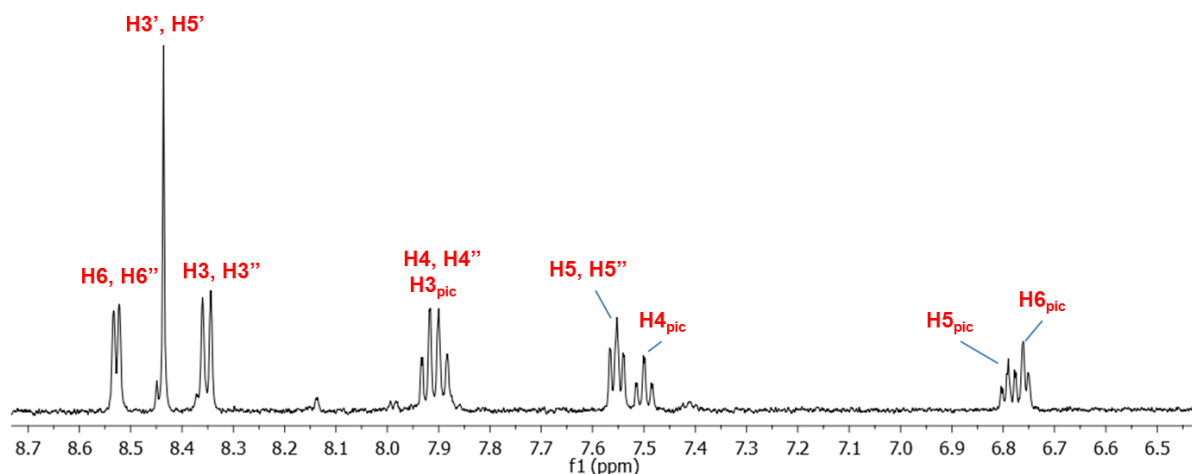
Карактеризација нових рутенијум(II) терпиридин комплекса **1** – **4** је вршена и помоћу инфрацрвене спектроскопије. Инфрацрвени спектри свих комплекса показују типичне траке које потичу од терпиридина, при чему је карактеристична јака трака у области од $1594\text{--}1616$ cm^{-1} , која одговара симетричној вибрацији C=N и C=C везе.(261)¹¹ (262)¹² На 789 и 654 cm^{-1} постоје сигнали који потичу од валенционих вибрација Ru–N везе. На инфрацрвеном спектру новосинтетисаног комплекса **4** постоје две додатне траке на 1630 и 1343 cm^{-1} , које потичу од асиметричних и симетричних вибрација карбоксилата.

4.1.4. NMR спектри рутенијум(II) терпиридин комплекса

Сви комплекси су карактерисани помоћу 1D (^1H и ^{13}C) или 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC и ^1H - ^{13}C HMBC) NMR спектроскопије. ^1H и ^{13}C NMR спектри [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl комплекса (**1**) у CD_3NO_2 су у складу са C_s симетријом у раствору због конформацијске мобилности етилендиамина. На ^1H NMR спектру могу се уочити пет сигнала у ароматичној области који одговарају једнаким половинама Cl-tpy лиганда и три мултиплета која се приписују en. Четврти мултиплет који потиче од en и који је преклопљен са широким сигналом HOD, може се уочити у ^1H - ^1H COSY NMR спектру. Овај сигнал је приписан NH_2 протонима који су под заштитним утицајем суседног Cl-tpy лиганда. ^{13}C NMR спектар показује осам сигнала у области нижег поља који су додељени ароматичним угљениковим атомима и два, делимично преклопљена, у области вишег поља, приписана угљениковим атомима из en. Утврђивање кватернерних угљеникових атома (C2'/C6', C2/C2" и C4') је постигнуто помоћу 2D хетеронуклеарног ^1H - ^{13}C HMBC NMR експеримента. ^1H и ^{13}C NMR спектри [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl

комплекса (**2**) у CD_3NO_2 су компликованији у односу на одговарајуће NMR спектре комплекса **1**, због конформационе крутости координованог *dash* лиганда, која доводи до губитка симетричности Cl-*tru* лиганда. Тако да, на ^1H NMR спектру, сигнали који потичу од протона две сада неједнаке половине Cl-*tru* лиганда су делимично преклопљени осим за Hб/Hб" (два дублета на $\delta = 8,98$ и $8,93$ ppm) и Hз'/Hз' (два дублета на $\delta = 8,39$ и $8,36$ ppm), који су јасно раздвојени. На ^{13}C NMR спектру можемо уочити за сваки угљеников атом Cl-*tru* и *dash* јасно раздвојен сигнал. ^1H NMR спектар $[\text{Ru}(\text{Cl-}tru)(bpu)\text{Cl}]\text{Cl}$ комплекса (**3**) у D_2O (за разлику од комплекса **1** и **2**, довољно стабилан) је у складу са симетријом комплекса: пет сигнала приписано симетричном Cl-*tru* лиганду и осам мултиплета који потичу од нееквивалентних половина *bpu* лиганда. Треба напоменути да сваки пик који потиче од протона аксијалног прстена *bpu* лиганда је значајно померен ка нижим вредностима хемијског померања у односу на пикове одговарајућих протона другог прстена (нпр. $\delta = 6,95$ ppm за H_i, а $\delta = 7,99$ ppm за H_b) због заштитног ефекта Cl-*tru*. Сходно томе, протони терминалних ароматичних прстенова Cl-*tru* су под утицајем *bpu*, тако да су и њихови сигнали значајно померени ка вишем пољу, а нарочито сигнал Hб/Hб" протона који се налази на $\delta = 7,79$ ppm, што је за око 1 ppm више него код комплекса **1** и **2**.

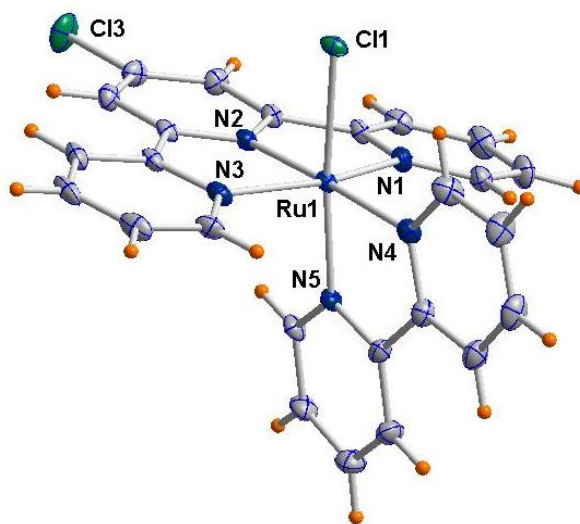
^1H NMR спектар $[\text{Ru}(\text{Cl-}tru)(pic)\text{Cl}]\text{Cl}$ комплекса (**4**) у CD_3CN указује на постојање само једне врсте, иако су у теорији могућа два изомера комплекса **4**, један у коме је Cl⁻ *trans* у односу на азотов атом пиколина N_{pyridine}, и други у коме је Cl⁻ *trans* у односу на кисеоников атома O_{carboxyl}. Сигнали који потичу од протона H5_{pic} и H6_{pic} ($\delta = 6,79$ и $6,76$ ppm) су померени ка нижим вредностима хемијског померања због заштитног ефекта Cl-*tru* лиганда. То указује да је пиридински прстен пиколина испод равни Cl-*tru* лиганда, односно *trans* у односу на Cl⁻ (Слика 16). Сходно томе, протони Cl-*tru* лиганда, нарочито Hб/Hб", нису под заштитним утицајем *pic* лиганда, као што је у случају *bpu* лиганда, тако да се налазе у области хемијског померања која је типична за *tru* лиганд.



Слика 16. ^1H NMR спектар $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{pic})\text{Cl}]$ комплекса у CD_3CN .

4.1.5. Кристална структура $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ комплекса (3)

Молекулска структура катјонског комплекса $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ (3) је одређена у чврстом стању помоћу рендгенске структурне анализе. (252) Резултати рендгенске структурне анализе су показали да комплекс има типичну издужену октаедарску структуру, који садржи тридентатни Cl-tpy лиганд у очекиваном меридијалном положају, *N-N* бидентатни хелатни лиганд bpy и шесто место окупирано је јоном хлора. (Слика 17)



Слика 17. Структура комплекса $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ (252)

Одабране дужине и углови веза у $[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl]Cl$ комплексу су дати у Табели 15. (252)

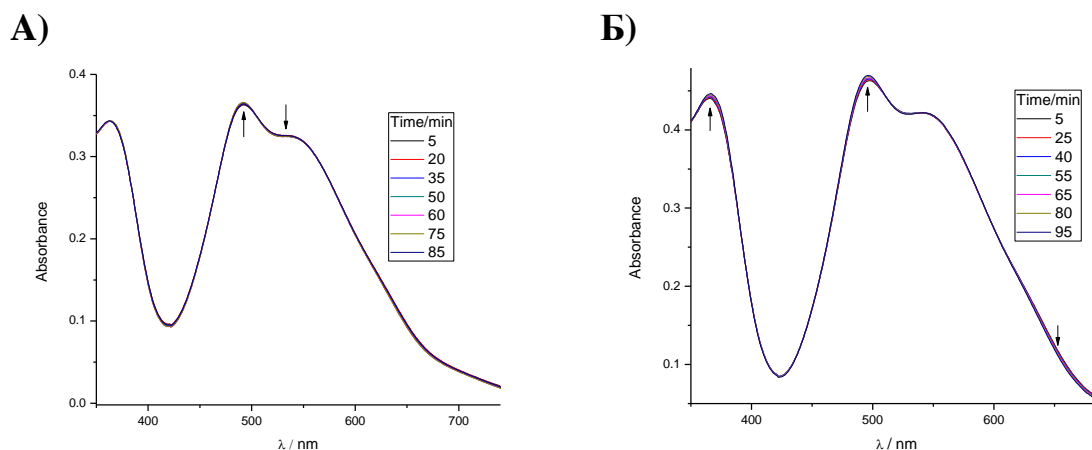
Табела 15. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у молекулу $[Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl]Cl$

Дужине веза (Å)	
Ru(1)–N(1)	2,067(3)
Ru(1)–N(2)	1,953 (3)
Ru(1)–N(3)	2,064 (3)
Ru(1)–N(4)	2,079 (3)
Ru(1)–N(5)	2,032 (3)
Ru(1)–Cl(1)	2,4205 (9)
Углови веза (°)	
N(3)–Ru(1)–N(1)	158,84 (12)
N(2)–Ru(1)–N(4)	177,28 (12)
N(5)–Ru(1)–Cl(1)	172,05 (9)

4.2. UV-Vis испитивање реакције комплекса 1 и 2 са аминокиселином L-хистидин

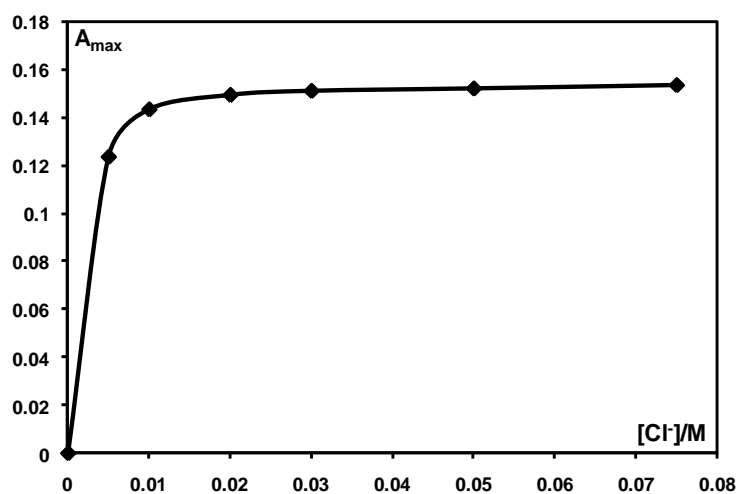
Иако много мање истраживане од интеракција комплекса са ДНК, интеракције комплекса са протеинима заслужују велику пажњу, посебно зато што такве студије не би само осветиле механизам деловања, већ и помогле у идентификовању нових мета у терапији лековима. (263, 230, 264) На ефикасност лека може утицати степен до ког се везује за протеине у крвној плазми. Протеини крвне плазме за које се лекови везују су хумани серумски албумин (HSA) и трансферин. Нарочито, након што су остаци аминокиселине L-хистидин на површини албумина и трансферина били окарактерисани као места везивања за рутенијум(II) и рутенијум(III), (23, 225, 226) кинетика интеракције хистидина са два рутенијум(II) терпиридин комплекса је проучавана у овој Докторској дисертацији.

Кинетика супституционих реакција комплекса 1 и 2 са L-хистидином (L-His) испитивана је спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена (Графикон 10.).



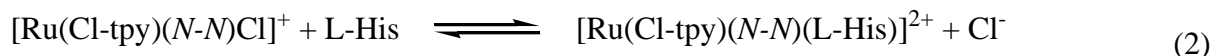
Графикон 10. Промена апсорбанце са временом током интеракције комплекса А) $[Ru(Cl-try)(en)Cl][Cl]$ (1) и Б) $[Ru(Cl-try)(dach)Cl][Cl]$ (2) са *L-His* у 25 mM *Hepes* пуферу (30 mM NaCl, pH 7,4) на 310 K.

Реакције су изучаване као реакције *pseudo*-првог реда, при чему је концентрација лиганда била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију полазног комплекса. Све супституционе реакције изучаване су у присуству 30 mM NaCl, како би се сузбила хидролиза комплекса. Ова вредност је одређена пре кинетичких мерења као минимална концентрација хлорида за коју нису уочене спектралне промене (Графикон 11). Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма *Origin 8*.



Графикон 11. Промена апсорбанце у зависности од концентрације хлорида, $[Cl^-]$, за $[Ru(Cl-try)(en)Cl]^+$ комплекс (1) на 401 nm у 0,1M NaClO₄ (310 K)

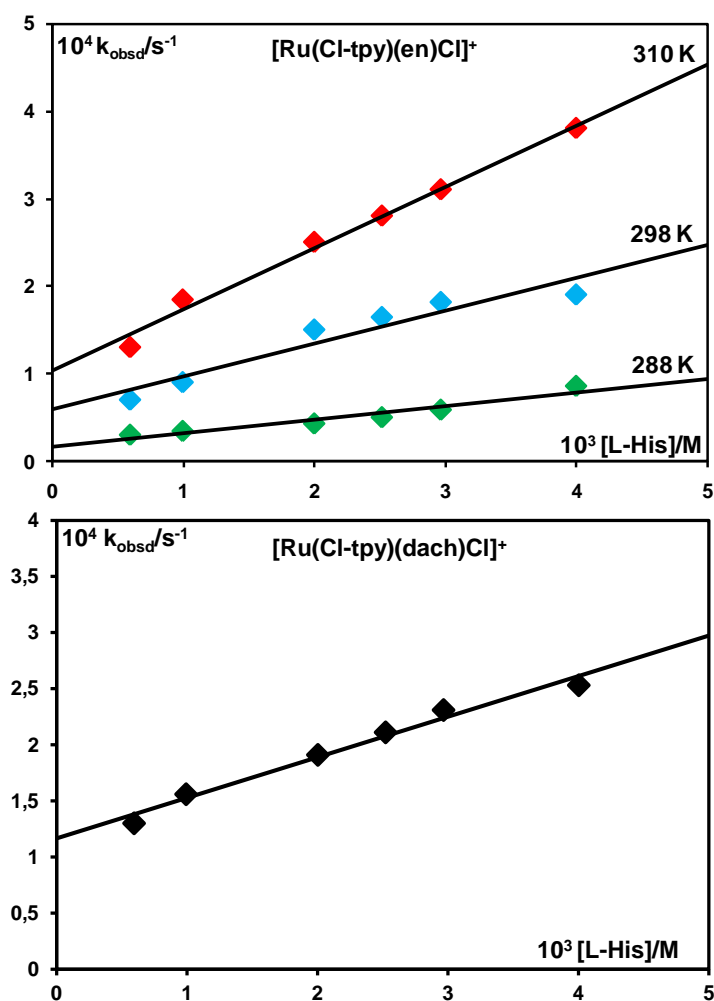
Супституционе реакције комплекса **1** и **2** са L-хистидином могу бити представљене једначином (2), у којој *N-N* означава бидентатни инертни лиганд (en или dach). Константа k_2 је константа брзине реакције другог реда и карактерише реакцију директне супституције, док константа k_1 карактерише реверзибилни процес.



Повезаност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , са поменутиим константама за директан и повратан процес супституције дата је једначином (3):

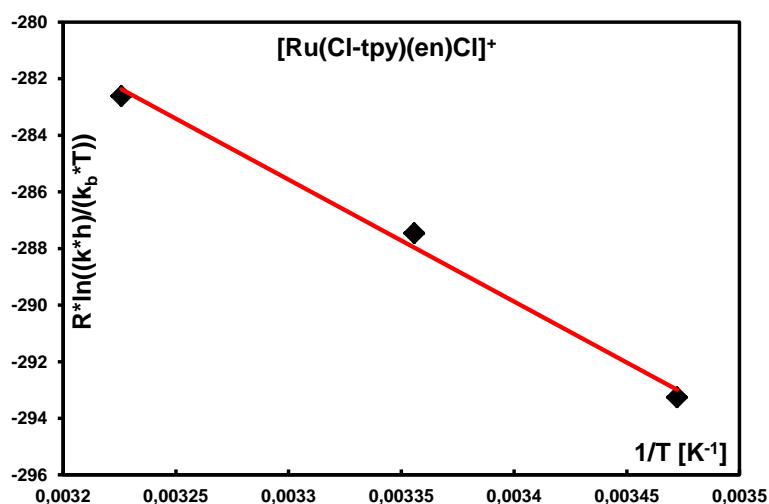
$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[\text{L}] \quad (3)$$

На Графикону 12 приказана је експериментално добијена зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , у односу на концентрацију улазног лиганда и температуру.



Графикон 12. Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције комплекса $[\text{Ru}(\text{tpy-Cl})(\text{en})\text{Cl}]^+$ и $[\text{Ru}(\text{tpy-Cl})(\text{dach})\text{Cl}]^+$ са L-His у 25 mM Нерес пуферу (30 mM NaCl, pH = 7,4)

На основу Графикана 12 може се видети да је у свим случајевима добијена линеарна зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда од концентрације улазног лиганда. Константа брзине директне реакције супституције, k_2 , је израчуната из нагиба добијених права, док је константа која карактерише повратни процес k_1 израчуната из одсечка, подељена са концентрацијом хлорида, $[Cl^-]$, (30 mM NaCl). Добијене вредности за константе брзине дате су у Табели 16. Вредности за термодинамичке активационе параметре (ΔH_2^\ddagger и ΔS_2^\ddagger) добијене су на основу Eyring-овог плота (Графикон 13).



Графикон 13. Eyring-ов плот за реакцију комплекса **1** са L-His, на pH 7,40 у 25 mM Hepes пуферу и 30 mM NaCl.

Табела 16. Константе брзине и активациони параметри за реакције супституције комплекса **1** и **2** са L-His (25 mM Hepes пуфер, 30 mM NaCl, pH = 7,4)

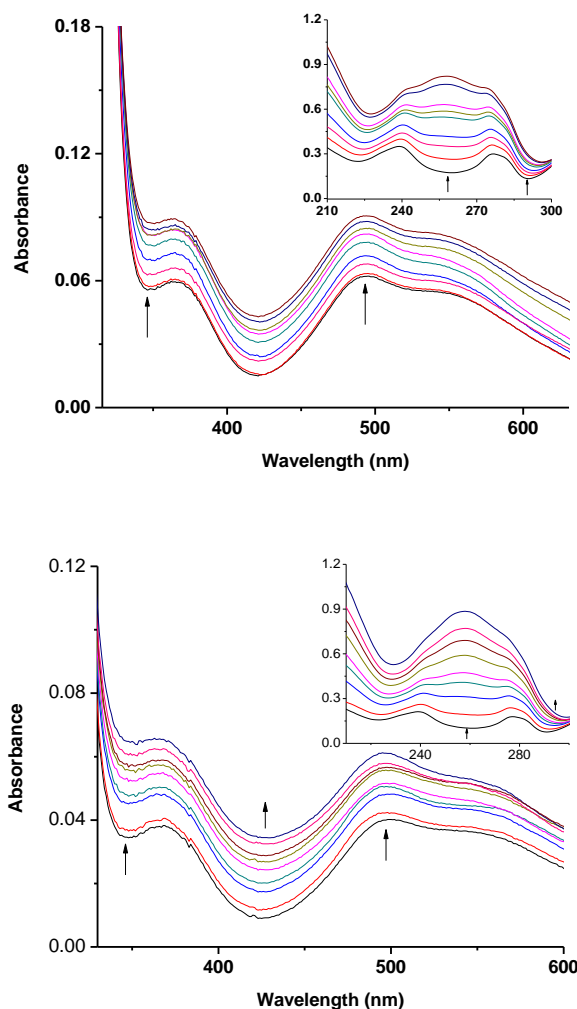
	T [K]	$k_2 [10^{-2} M^{-1}s^{-1}]$	$k_1 [10^{-4} M^{-1}s^{-1}]$	$\Delta H_2^\ddagger [kJmol^{-1}]$	$\Delta S_2^\ddagger [JK^{-1}mol^{-1}]$
L-His					
1 (en)	288	2.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3	44 ± 4	-145 ± 12
	298	4.0 ± 0.6	20.0 ± 7.0		
	310	7.0 ± 0.4	34.0 ± 4.0		
2 (dach)	310	3.6 ± 0.3	33 ± 2.0		

4.3. Интеракције комплекса са ДНК

4.3.1. Електронска апсорпциона спектроскопија

Електронска апсорпциона спектроскопија једна је од најважнијих метода за одређивање начина везивања комплекса јона метала за ДНК. Интензитет апсорпције комплекса може се смањити (хипохромни ефекат) или повећати (хиперхромни ефекат) са благим повећањем таласне дужине апсорпције (батохромни ефекат) након везивања за ДНК.

Снимљени су UV спектри за серију раствора која садржи константну концентрацију комплекса, а различиту концентрацију ДНК. UV спектри комплекса **1** и **2** у присуству и одсуству ДНК приказани су на Графикон 14. На основу UV спектра комплекса **1** може се видети да на таласној дужини 493 nm постоји хиперхромни ефекат након додавања ДНК, што потврђује везивање за ДНК. Осим тога, на 222 и 291 nm јавља се црвено померање (батохромни ефекат) од 5 nm (до 227 и 296 nm), указујући на стабилизацију ДНК дуплекса. Понашање комплекса **2** је слично (на 495 nm јавља се хиперхромни ефекат) након додавања раствора ДНК растуће концентрације (Графикон 14). Апсорпциони максимум на 424 nm показује хиперхромно померање заједно са црвеним померањем од 4 nm (до 428 nm).

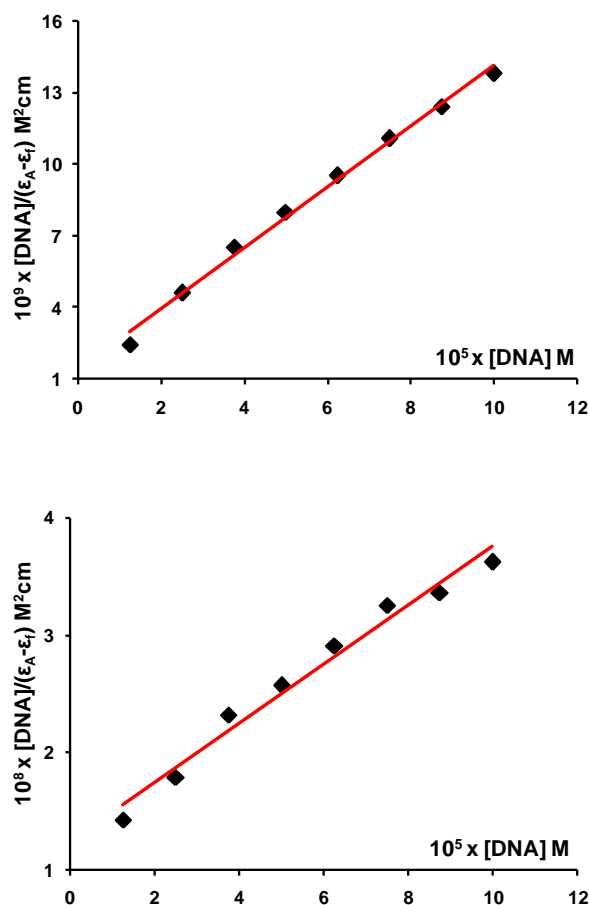


Графикон 14. Абсорпциони спектри комплекса **1** и **2** у *Tris-HCl* пуферу након додатка ДНК. $[Ru] = 1.25 \times 10^{-5} M$, $[ДНК] = (0.12-1.25) \times 10^{-5} M$. Стрелица указује на промене након додавања ДНК раствора растуће концентрације.

Константа везивања K_b одређује се праћењем промена абсорбанце на одговарајућој таласној дужини након додавања ДНК раствора растуће концентрације помоћу следеће једначине (4):

$$[ДНК]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [ДНК]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad (4)$$

K_b се израчунава из односа нагиба и одсечка праве $[ДНК]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = f([ДНК])$ (Графикон 15), где је $[ДНК]$ концентрација ДНК, $\epsilon_A = A_{obsd}/[complex]$, ϵ_f је екстинциони коефицијент некоординованог комплекса, а ϵ_b је екстинциони коефицијент координованог комплекса.



Графикон 15. Зависност $[\text{ДНК}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ од концентрације $[\text{ДНК}]$ за комплексе **1** и **2**.

Добијене вредности за константу везивања K_b за комплексе **1** и **2** приказане су у Табели 17. Вредности K_b указују на снажно везивање комплекса за ДНК, при чему комплекс **1** ($1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) показује већи афинитет везивања за ДНК у односу на комплекс **2** ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Међутим, K_b вредности комплекса **1** и **2** су мање у односу на класични интеркалатор етидијум-бромид (ЕБ), чији је афинитет везивања за ДНК $1,23 (\pm 0,07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Табела 17. ДНК константа везивања (K_b) и Stern–Volmer-ова константа (K_{sv}).

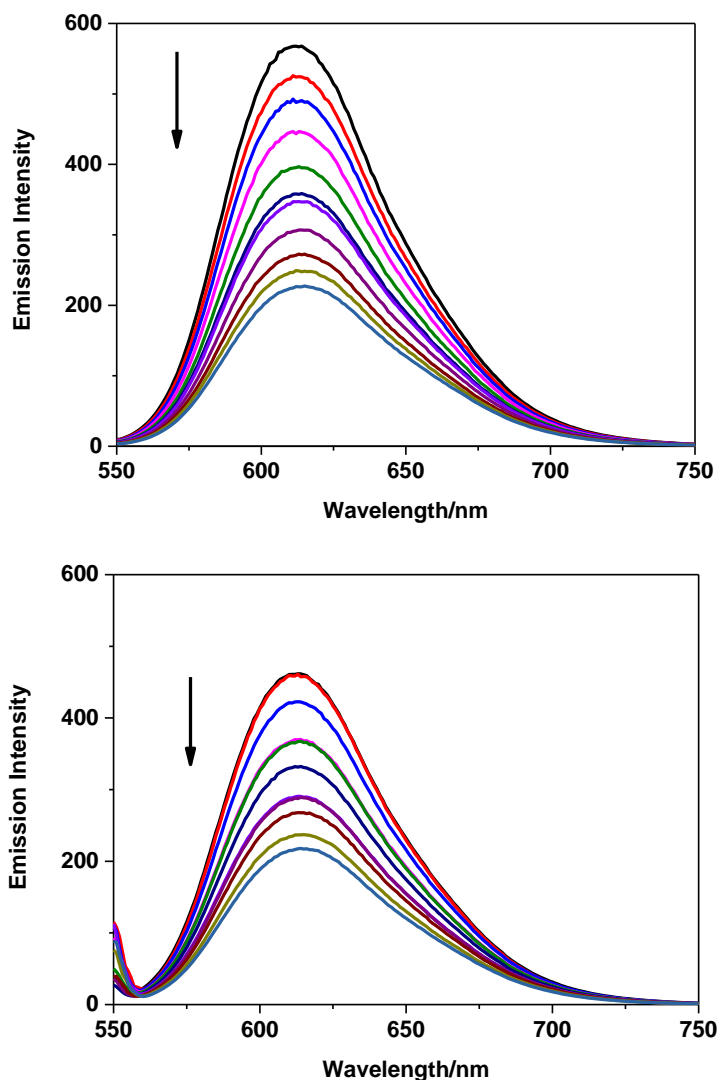
	$K_b [\text{M}^{-1}]$	$K_{sv} [\text{M}^{-1}]$
$[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ 1	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$
$[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ 2	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$

4.3.2. Флуоресцентна испитивања

Етидијум-бромид (ЕБ) је класичан интеркалатор који показује значајан интензитет флуоресцентне емисије када је интеркалиран између база ДНК. Када је замењен или искључен из унутрашњег хидрофобног окружења ДНК хеликса, од стране других молекула, његова флуоресцентна емисија се смањује помоћу спољашних поларних молекула растварача (као што је вода).

Комплекси **1** и **2** не показују никакву значајну флуоресценцију на собној температури у раствору или у присуству ДНК, када се побуде на 527 nm. Додавање комплекса **1** и **2** у раствор који садржи ЕБ не утиче на његову флуоресценцију и не изазива појаву нових пикова у спектру. Промене добијене у спектрима ЕБ-а када се веже за ДНК често се користе за проучавање везивања комплекса метала за ДНК, с обзиром да додавање комплекса, који је способан да интеркалира ДНК исто или јаче него ЕБ, може довести до смањења флуоресцентне емисије ЕБ-ДНК једињења.

На Графикону 16 представљена је зависност интензитета емисије ЕБ везаног за ДНК у одсуству и присуству комплекса у функцији таласне дужине. Додавање раствора комплекса **1** и **2** растућих концентрација (до $r = 1,0$) доводи до значајног смањења интензитета емисије на 612 nm, што указује на конкуренцију између комплекса и ЕБ при везивању за ДНК (Графикон 16). Смањење интензитета флуоресценције ДНК-ЕБ комплекса указује на то да испитивани рутенијум комплекси **1** и **2** могу да истисну ЕБ из ЕБ-ДНК једињења и реагују са ДНК путем интеркалације.

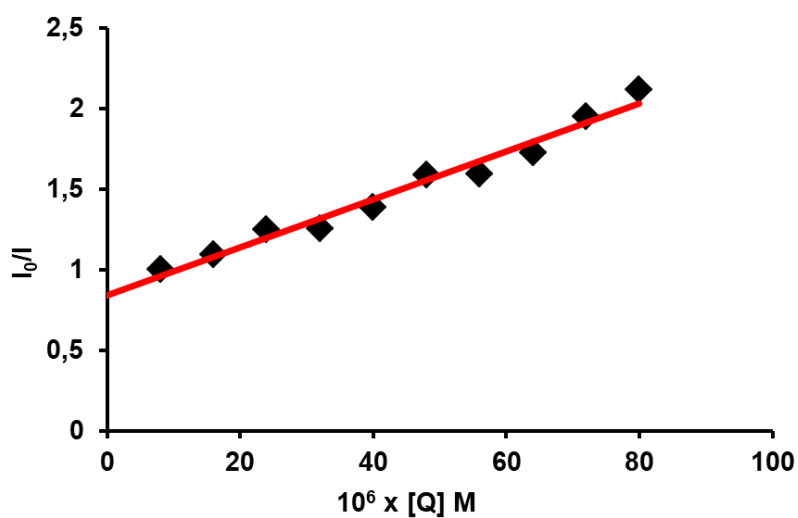
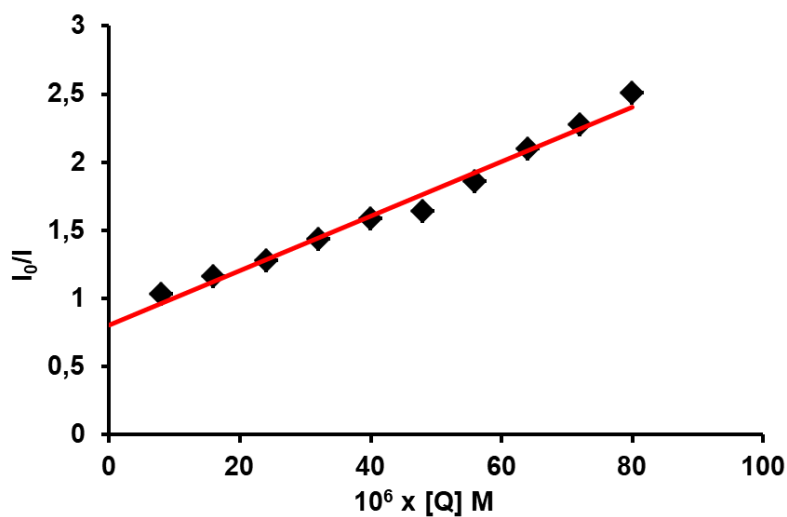


Графикон 16. Емисиони спектар везивања ЕБ за ДНК у присуству комплекса **1** и **2**. $[EB] = 80 \mu M$, $[ДНК] = 80 \mu M$; $[Ru] = 0-80 \mu M$; $\lambda_{ex} = 527 nm$. Стрелице показују промене интензитета након додавања раствора комплекса растуће концентрације. Зависност I_0/I од концентрације $[Q]$, где су са (■) означене експериментално добијене тачке, а пуне линије представљају линеарну зависност.

Релативно везивање комплекса **1** и **2** за ДНК одређује се израчунавањем Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) применом Stern-Volmer-ове једначине (5):

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \quad (5)$$

где су I_0 и I интензитети емисије у одсуству и присуству комплекса **1** и **2**, $[Q]$ је укупна концентрација комплекса, K_{sv} је Stern-Volmer-ова константа, која се може добити из нагиба праве зависности I_0/I од концентрације комплекса $[Q]$ (Графикон 17).

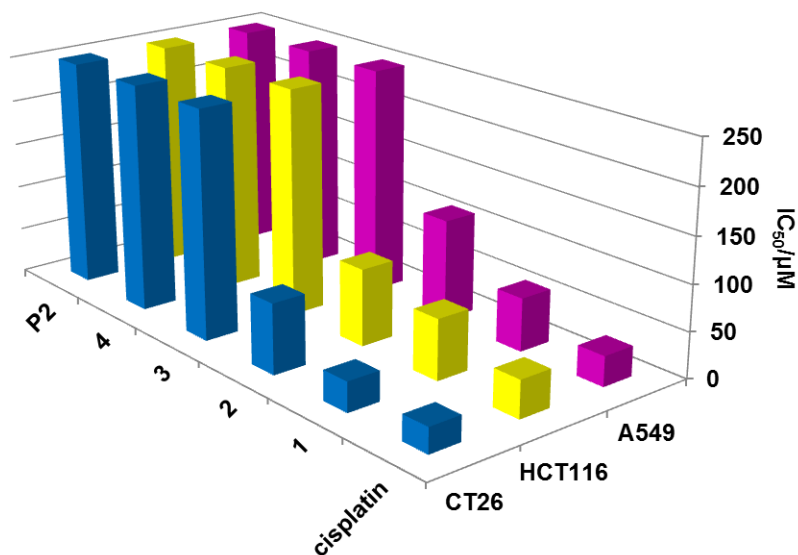


Графикон 17. Зависност I_0/I од концентрације $[Q]$, где су са (■) означене експериментално добијене тачке, а пуне линије представљају линеарну зависност.

Оба комплекса имају високе вредности Stern-Volmer-ове константе (Табела 17): $2,1 \times 10^4$ за **1** и $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ за **2**, указујући на њихову велику ефикасност да замене ЕБ и вежу се снажно за ДНК, што је у сагласности са високим вредностима константи везивања K_b добијених помоћу UV-Vis спектрофотометрије.

4.4. *In vitro* антиканцерогена активност комплекса 1 - 4

Цитотоксичност Ru(II) терпиридин комплекса 1 - 4 испитивана је према ћелијским линијама карцинома плућа (A549), карцинома дебелог црева (HCT116) и карцинома дебелог црева миша (CT26) помоћу МТТ теста. (253) Ради поређења, испитана је и цитотоксичност цисплатине. Цитотоксичност комплекса 1 - 4 зависи од примењене дозе, односно, са повећањем концентрације опада одрживост ћелије. Добијене IC₅₀ вредности комплекса приказане су на Графикону 18.



Графикон 18. Добијене IC₅₀ вредности за цисплатину и комплексе 1 - 4 на различитим ћелијским линијама канцера након 72 h.

4.5. Новосинтетисани комплекс рутенијума [Ru(H₂L^{t-Bu})Cl₃] смањују вијабилност ћелија мишјег карцинома колоне CT26 *in vitro*

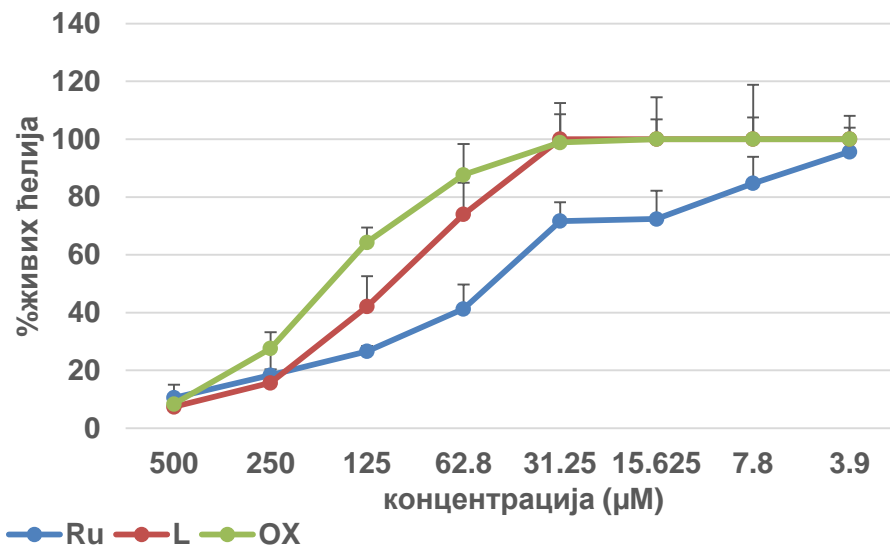
Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума је испитиван на ћелијским линијама мишјег карцинома колоне CT26 *in vitro* коришћењем МТТ теста. У овим експериментима испитивана је временски и дозно зависна цитотоксичност комплекса рутенијума. CT26 ћелијска линија је култивисана 24 и 72 сата у двоструко растућим разблажењима комплекса почетне концентрације 500 µM, а цитотоксичност је

утврђивана индиректно, одређивањем процента вијабилних ћелија. Као контролне супстанце коришћени су: оксалиплатина за коју се зна да испољава антитуморски ефекат на ћелијама карцинома колоне и лиганд који је коришћен за грађење комплекса рутенијума. Резултати МТТ теста указују да је испитани комплекс рутенијума цитотоксичан за СТ26 ћелије и након 24 и након 72 сата излагања (Графикон 19а и 19б). Интересантно је да комплекс рутенијума након 24 сата показује значајно израженији цитотоксички ефекат у поређењу са ефектима стандардног хемиотерапеутика оксалиплатине. Цитотоксичност лиганда у поређењу са ефектом комплекса рутенијума након 24 сата излагања је значајно мања, а у нижим дозама је слична ефекту оксалиплатине (Графикон 19А).

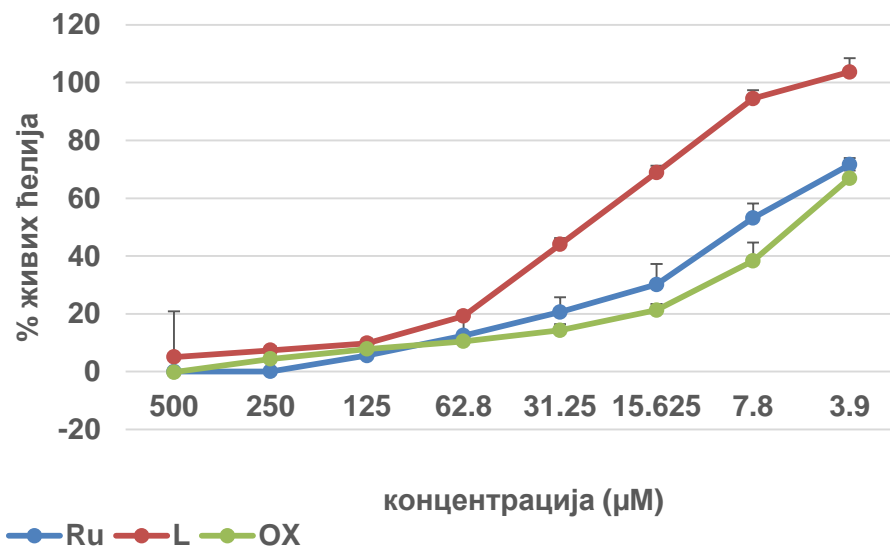
Цитотоксички потенцијал комплекса рутенијума и оксалиплатине након 72 сата излагања СТ26 ћелија је веома сличан, као што се види на графикону 1Б, а и у табели 18 која приказује концентрације комплекса које убијају 50% туморских ћелија. Цитотоксичност лиганда након излагања СТ26 ћелија 72 сата је мања у поређењу са цитотоксичношћу комплекса рутенијума и оксалиплатине (Графикон 19Б).

Резултати приказани на Табели 18 указују да комплекс рутенијума испољава временски завистан ефекат. IC50 вредност за комплекс рутенијума након 24 сата излагања је скоро дупло мања у поређењу са IC50 вредношћу за оксалиплатину, али након 72 сата IC50 вредности за комплекс рутенијума и оксалиплатину се значајно смањују и веома се мало разликују ($7,49 \pm 1,98$ vs $3,69 \pm 1,01$). IC50 вредност за лиганд након 72 сата излагања је вишеструко већа у поређењу са вредностима за комплекс рутенијума и оксалиплатину.

A



Б

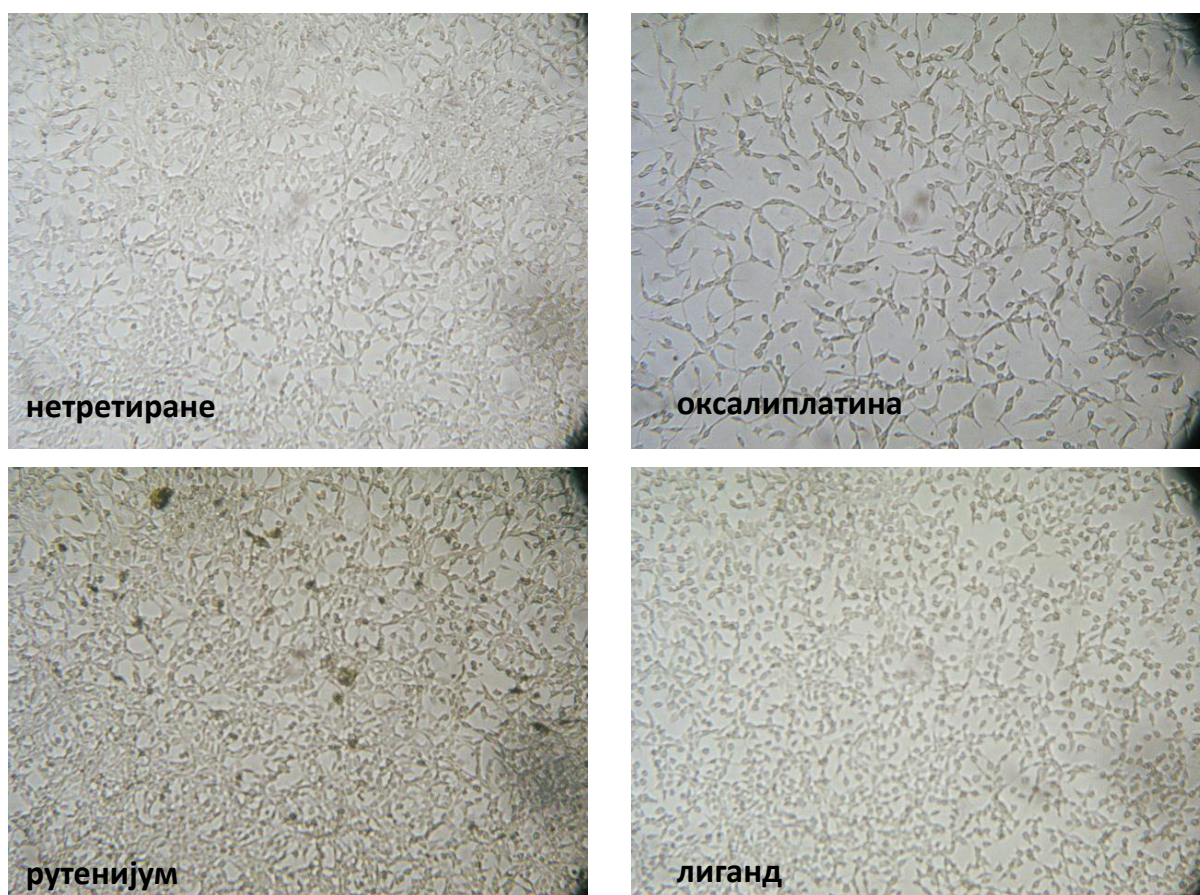


Графикон 19. Цитотоксичност комплекса рутенијума на мишијој линији карцинома колона СТ26 после 24 и 72 сата излагања (мерено МТТ тестом). Резултати су приказани као средња вредност за 3 понављања, а сваки од експеримента је рађен у трипликату.

једињење	24 сата	72 сата
рутенијум	50,81±7,15	7,49±1,98
лиганд	146,16±20,87	33,76±7,19
оксалиплатина	97,12±16,22	3,69±1,01

Табела 18: IC50 вредности комплекса рутенијума за ћелијску линију СТ26 након 24 и 72 сата излагања

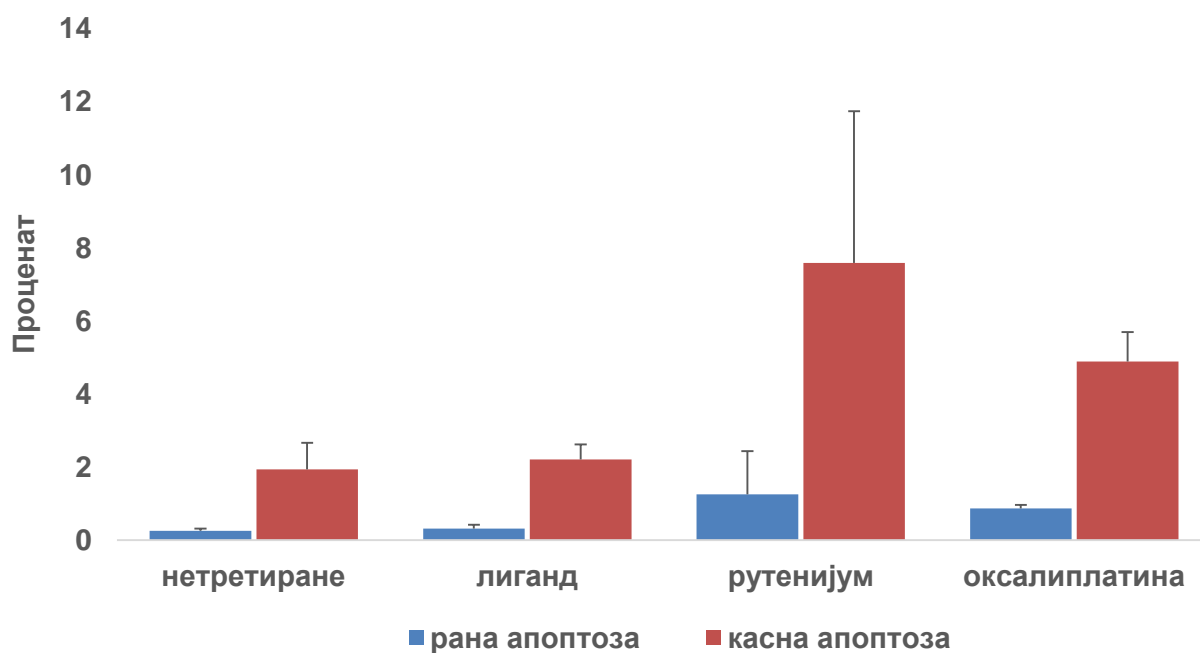
На слици 18 је приказана морфологија СТ26 ћелија након 72 сата излагања испитиваним једињењима. Уочава се да оксалиплатина смањује број СТ26 ћелија које адхерирају за пластику, док се у култури ћелија третираних рутенијумом не уочава толико смањење броја адхерентних ћелија, колико се уочава измењен облик. Ћелије излагане лиганду 72 сата показују измењену морфологију.



Слика 18. Морфологија СТ26 ћелија након 72 сата излагања испитиваном комплексу, лиганду и контролној супстанци

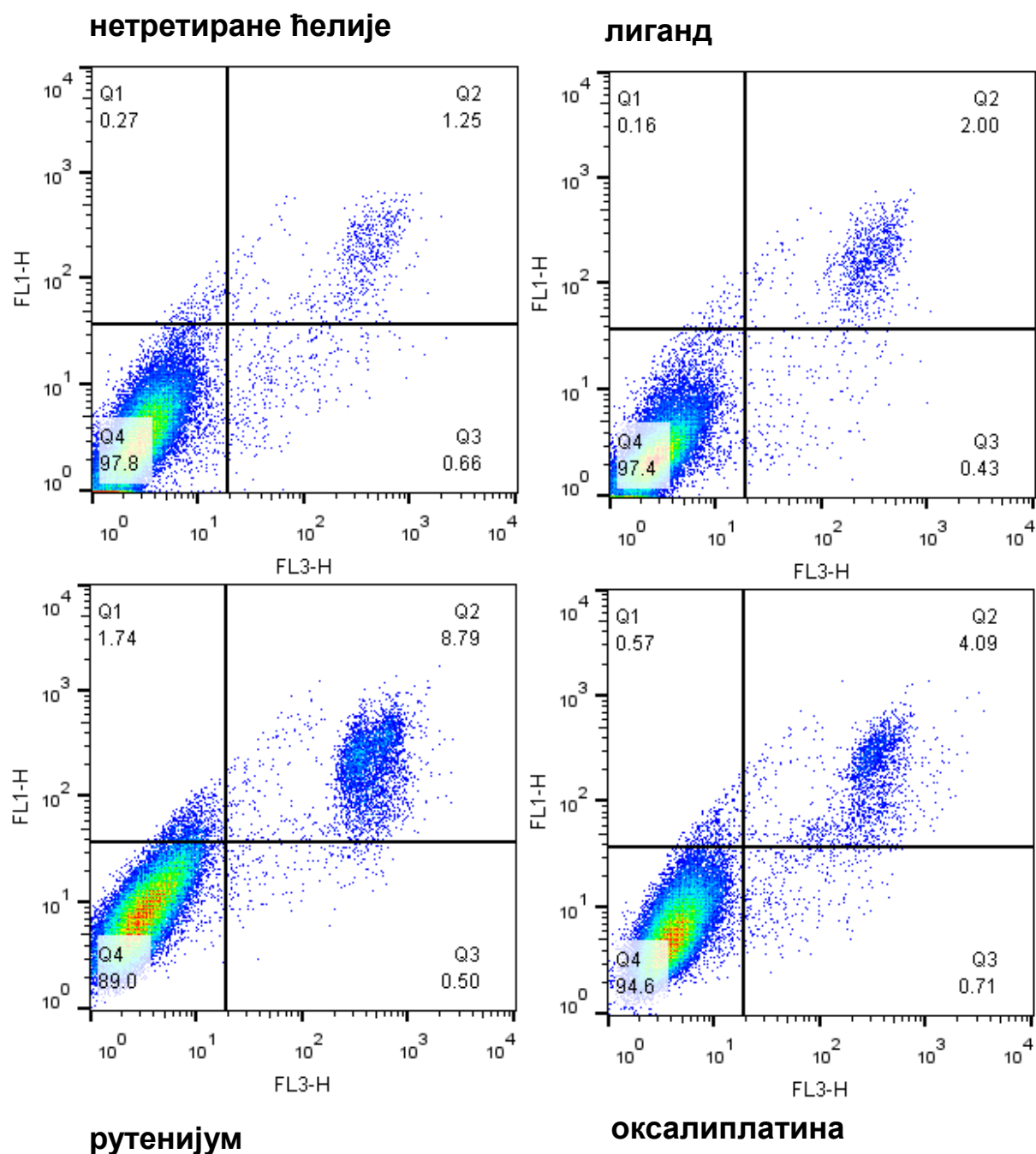
4.6. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс изазива апоптотску смрт СТ26 ћелија

Тест апоптозе је показао да испитивани комплекс рутенијума индукује апоптотску смрт СТ26 ћелија (Графикон 20, Слика 19). Двадесетчетири сата након излагања комплексу рутенијума (концентрација $40\mu\text{M}$) већина мртвих ћелија је у касној апоптози (AnnexinV+PI+ ћелије). Процент апоптотичних СТ26 ћелија након излагања комплексу рутенијума је већи у поређењу са ефектом који је на СТ26 ћелије испољила оксалиплатина. Лиганд након 24 сата излагања СТ26 ћелија скоро и да не индукује апоптозу, проценат апоптотичних ћелија третираних лигандом је скоро исти као и проценат СТ26 ћелија које су спонтано ушле у апоптозу.



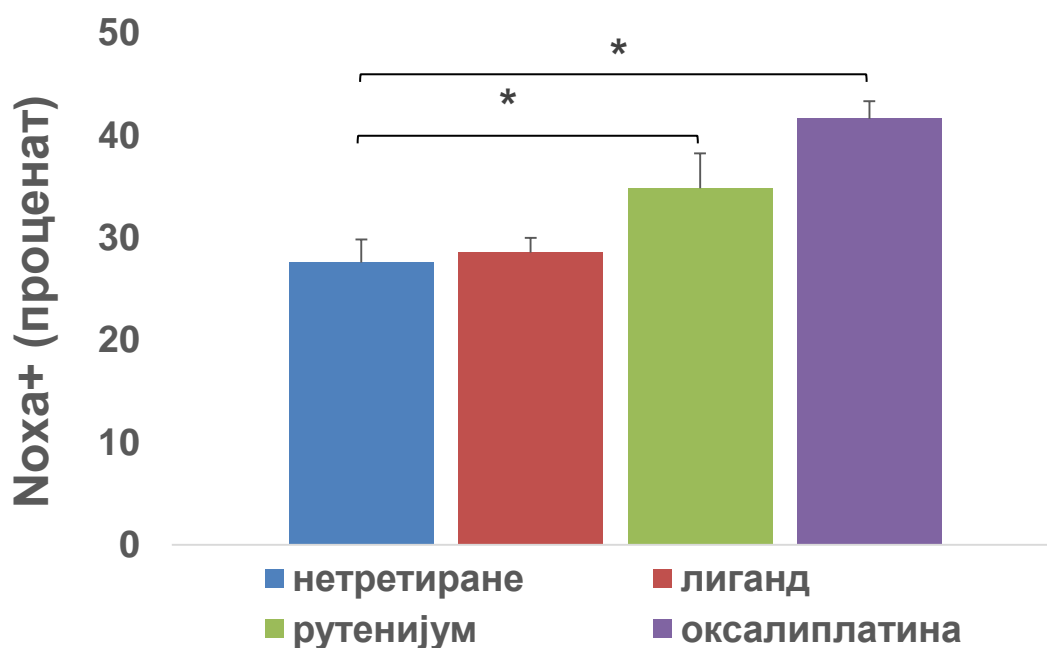
Графикон 20. Проапоптотски ефекат комплекса рутенијума на мишијој линији карцинома колоне СТ26 после 24 сата излагања. Након третирања СТ26 ћелија испитиваним комплексом, лигандом и оксалиплатином (концентрација $50\mu\text{M}$) обојене су анексином V и пропидијум јодидом и проточном цитометријом је детектован проценат ћелија у раној (анексин V+ пропидијум јодид-) и касној (анексин V+ пропидијум јодид-) апоптози. Као контролне ћелије коришћене су нетретиране (гајене само у медијуму) СТ26 ћелије. Резултати су приказани као средња вредност за 3 понављања.

Слика 19

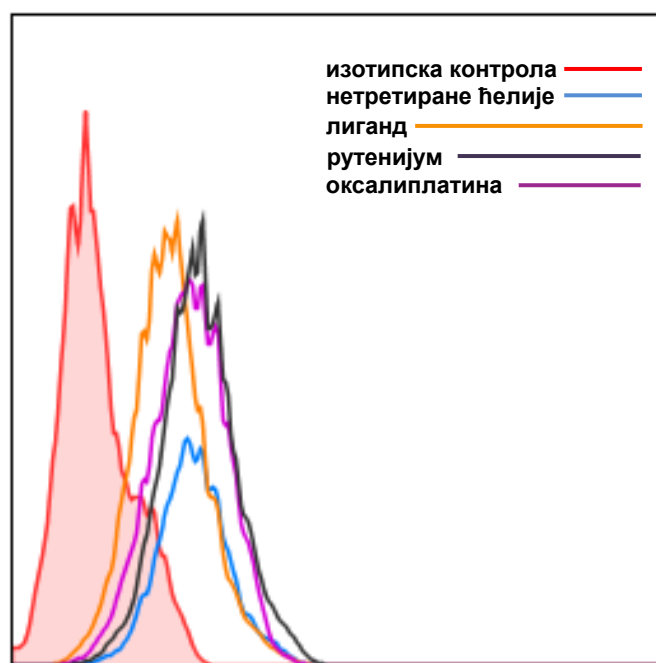


Слика 19. Репрезентативни dot-plot-ови CT26 ћелија третираних 24 сата испитиваним комплексом рутенијума, лигандом и оксалиплатином и контролних, нетретираних ћелија (концентрације 50 μ M) обојених анексином и пропидијум јодидом. Горњи леви квадрант – ћелије у раној апоптози, горњи десни квадрант - ћелије у касној апоптози, доњи леви квадрант - вијабилне ћелије, доњи десни квадрант - ћелије у некрози.

А



Б



Графикон 21. Комплекс рутенијума повећава проценат Noxa+ CT26 ћелија. Након третирања испитиваним комплексом, лигандом и оксалиплатином (концентрација 50 μ M) и ћелија гајених само у медијуму, CT26 ћелије су обојене анти-Noxa антителом и проточном цитометријом је детектован проценат Noxa+ ћелија. А) График приказује средњу вредност за Noxa+ ћелија у наведеним групама за 3 понављања. Б) Репрезентативни хистограм приказује проценат Noxa+ ћелија. Статистичка значајност разлике у проценту Noxa+ ћелија међу наведеним групама је одређена Student-овим *t* тестом; * $P < 0.05$.

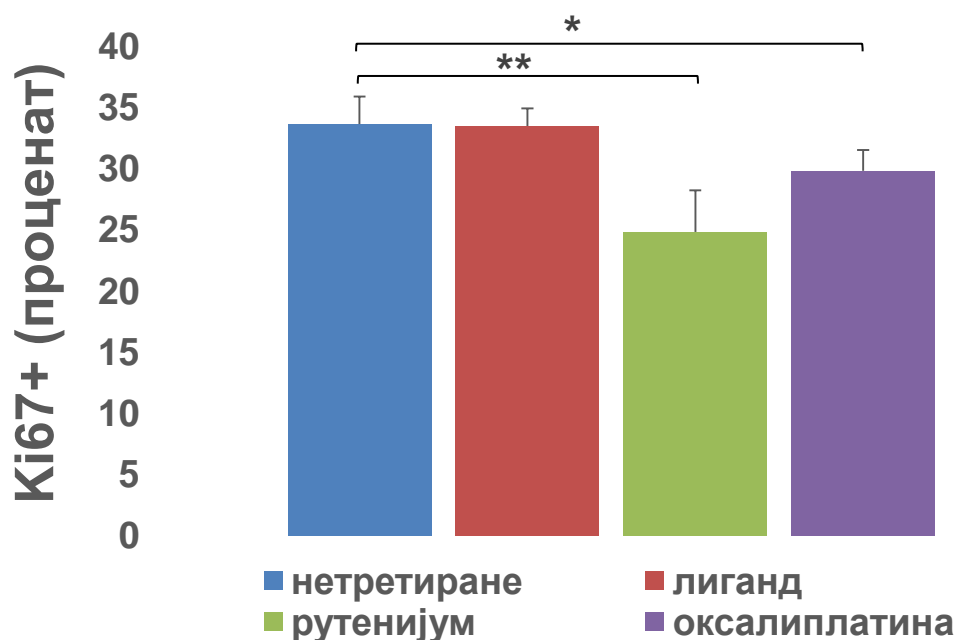
Како су досадашњи резултати показали да комплекс рутенијума смањује вијабилност и да индукује апоптотску смрт СТ26 ћелија, наредним експериментом је у тертираним и контролним ћелијама испитана експресија протеина Noxa који учествује у индукцији и спољашњем и унутрашњег пута апоптозе.

Као што се види на графикону 21 проценат СТ26 ћелија које експримирају Noxa протеин је статистички значајно већи у групи СТ26 ћелија третираних комплексом рутенијума у поређењу са групом нетретираних ћелија. Излагање СТ26 ћелија оксалиплатини је такође праћено значајним повећањем проценат Noxa позитивних ћелија у односу на контролу. Процент Noxa+ СТ26 ћелија након третирања оксалиплатином је већи него проценат Noxa+ ћелија након излагања комплексу рутенијума. али ова разлика није статистички значајна. Излагање СТ26 ћелија лиганду не повећава проценат ћелија које експримирају протеин Noxa (Графикон 21А). На графикону 21Б је приказан репрезентативни хистограм који приказује већи проценат Noxa+ ћелија након третирања комплексом рутенијума и оксалиплатине у поређењу са нетретираним ћелијама (линије хистограма за комплекс рутенијума и оксалиплатине су померено удесно у односу на линију која приказује нетретиране СТ26 ћелије).

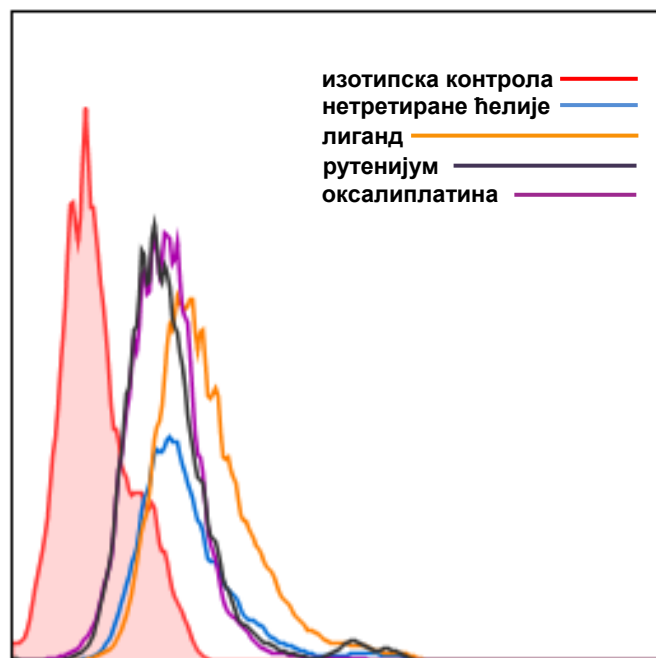
4.7. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс испољава антипролиферативни ефекат на СТ26 ћелије

Како би испитали антипролиферативни потенцијал комплекса рутенијума, анализирали смо експресију маркера пролиферације Ki67 у СТ26 ћелијама третираним комплексом рутенијума, оксалиплатином и лигандом. Као контролне ћелије коришћене су СТ26 ћелије гајене само у медијуму. Оксалиплатина смањује пролиферативни потенцијал ћелија карцинома колона, што се и уочава на графикону 22. Процент Ki67+ СТ26 ћелија третираних оксалиплатином је статистички значајно мањи ($P < 0.05$) у поређењу са процентом Ki67+ нетретираних СТ26 ћелија. Међутим комплекс рутенијума изазива статистички још значајније ($P < 0.01$) смањење процента Ki67+ СТ26 ћелија у односу на нетретиране ћелије (Графикон 22). Процент Ki67+ ћелија након третирања рутенијум је мањи у поређењу са процентом ових ћелија третираних оксалиплатином, али та разлика не достиже статистичку значајност. Излагање лиганду не смањује проценат Ki67+ ћелија у односу на ћелије излагане само медијуму (Графикон 22).

А



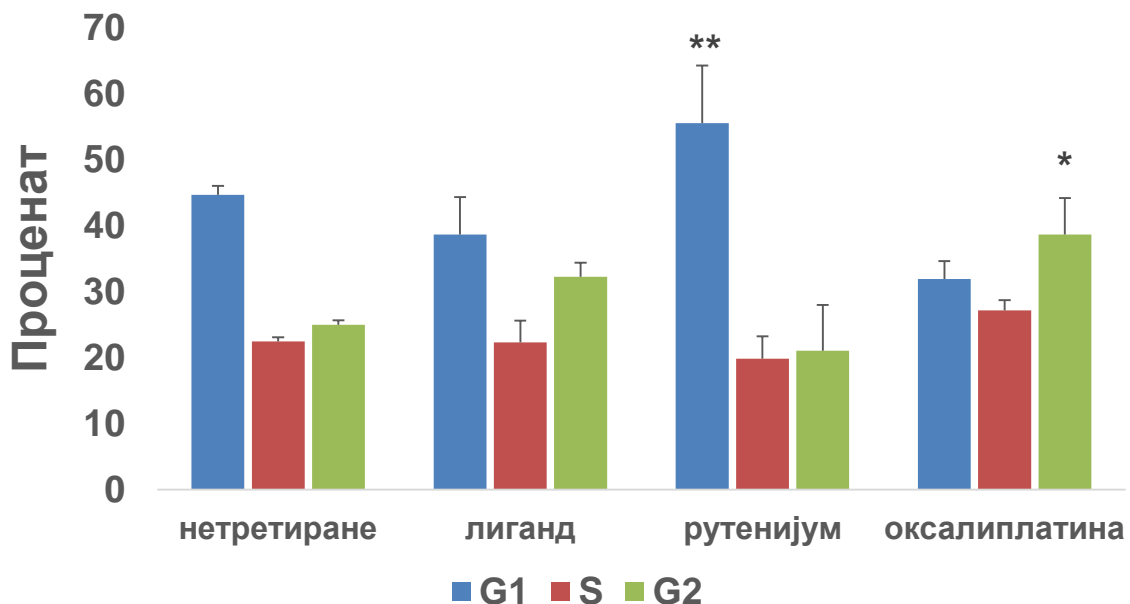
Б



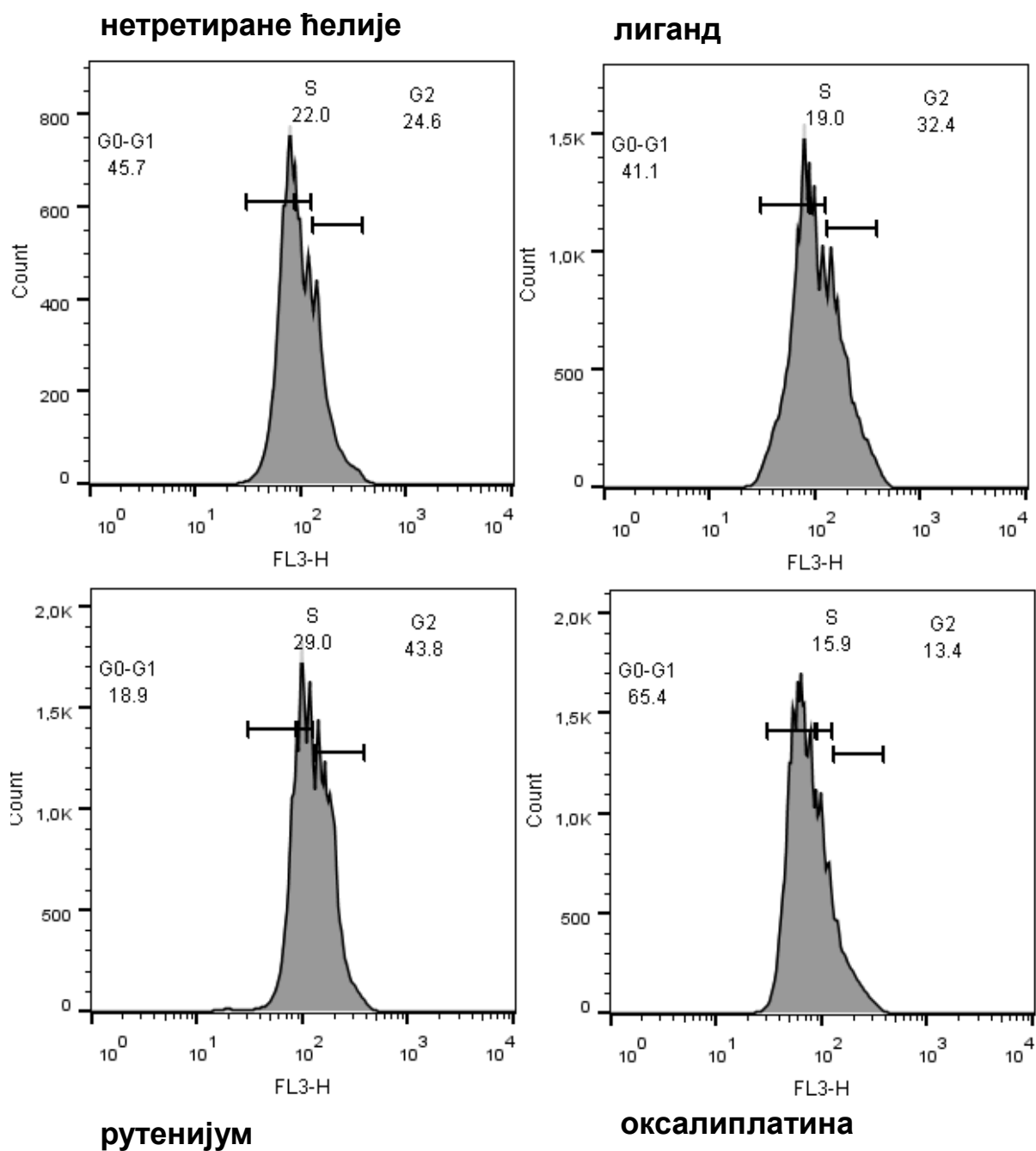
Графикон 22. Комплекс рутенијума смањује проценат Ki67+ СТ26 ћелија. Након третирања испитиваним комплексом, лигандом и оксалиплатином (концентрација 50 μ M) и ћелија гајених само у медијуму, СТ26 ћелије су обојене анти-Ki67 антителом и проточном цитометријом је детектован проценат Ki67+ ћелија. А) График приказује средњу вредност за Ki67+ ћелија у наведеним групама за 3 понављања. Б) Репрезентативни хистограм приказује проценат Ki67+ ћелија. Статистичка значајност разлике у проценту Ki67+ ћелија међу наведеним групама је одређена Student-овим *t* тестом; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

4.7.1. Анализа ћелијског циклуса

Анализа ћелијског циклуса је показала да су нетретиране, као и СТ26 ћелије ћелије третиране лигандом (концентрација 50 μ М) 24 сата у највећем проценту у G0/G1 фази ћелијског циклуса (Графикон 23). Поред тога излагање лиганду смањује проценат СТ26 ћелија у G1 фази, а повећава проценат ћелија у G2 фази, али без статистичке значајности. Излагање СТ26 ћелија оксалиплатини статистички значајно ($P < 0.05$) повећава проценат ћелија у G2 фази, а смањује проценат ћелија у G1 фази, у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 23). Комплекс рутенијума, за разлику од оксалиплатине зауставља ћелијски циклус у G2 фази. СТ26 ћелије излагане комплексу рутенијума се у највећем проценту налазе у G1 фази и проценат ових ћелија у G1 фази је статистички значајно ($P < 0.01$) већи од процента нетретираних СТ26 ћелија у G1 фази (Графикон 23).



Графикон 23. Комплекс рутенијума зауставља ћелијски циклус у G1 фази. Након третирања испитиваним комплексом, лигандом и оксалиплатином (концентрација 50 μ М) и ћелија гајених само у медијуму, СТ26 ћелије су обојене Rubi бојом и проточном цитометријом је детектован проценат ћелија у G1, S, G2 фази ћелијског циклуса. График приказује средњу вредност за Ki67+ ћелија у наведеним групама за 3 понављања. Статистичка значајност разлике у проценту Ki67+ ћелија међу наведеним групама је одређена Student-овим t тестом; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,



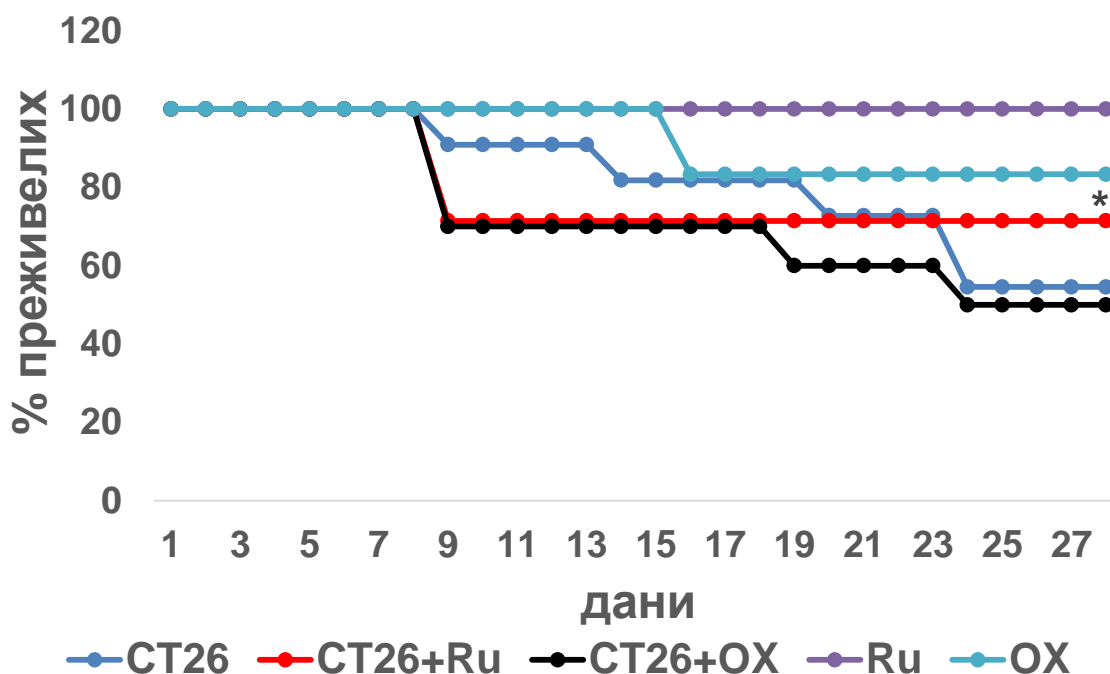
Слика 20. Репрезентативни хистограми који приказују дистрибуцију нетретираних ST26 ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса и након третиранија комплексом рутенијума, лигандом и оксалиплатином.

4.8. Антитуморски ефекат $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекса *in vivo* у хетеротопском моделу карцинома колона миша

Пошто смо показали да новосинтетисани комплекс рутенијума имају изражен цитотоксични и антипролиферативни ефекат на ћелије мишјег карцинома колона, наредно истраживање се односило на испитивање антитуморске активности комплекса *in vivo*. Као експериментални модел користили смо модел примарног хетеротопског карцинома колона који је изазван субкутаном апликацијом 10^6 СТ26 ћелија у дорзолумбални предео BALB/c миша. Мишеви су од осмог дана апликације туморских ћелија, што је и време појаве палпабилног тумора, примали интравенски испитивани комплекс рутенијума у дози 10 mg/kg телесне масе, а као контролну супстанцу примали су оксалиплатину у истој дози. Коришћене су још две групе контролних животиња које су примале или комплекс рутенијума, или оксалиплатину у истој дози. Све супстанце су примењиване три пута недељно у трајању од три недеље.

4.8.1. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс повећава преживљавање мишева са примарним тумором

Мишеви су праћени укупно четири недеље и ако што се види на графикону сви мишеви који су примали само комплекс рутенијума су преживели, док је преживљавање у групи мишева који су примали само оксалиплатину мање 83,33% (Графикон 24). Такође, примена комплекса рутенијума 8 дана након трансплантације туморских ћелија је статистички значајно повећала преживљавање у поређењу са групом мишева који су након примене туморских ћелија примали оксалиплатину (Графикон 24).



Графикон 24. Комплекс рутенијума повећава преживљавање мишева са примарним тумором. Мишеви су примили субкутано CT26 ћелије и од осмог дана су примали или комплекс рутенијума, или оксалиплатину или физиолошки раствор. Две групе мишева су примале само комплекс рутенијума или оксалиплатину, без претходне примене туморских ћелија. Крива преживљавања приказује преживљавање мишева у току четири недеље од примене туморских ћелија. * $P < 0.05$ у односу на CT26+OX групу.

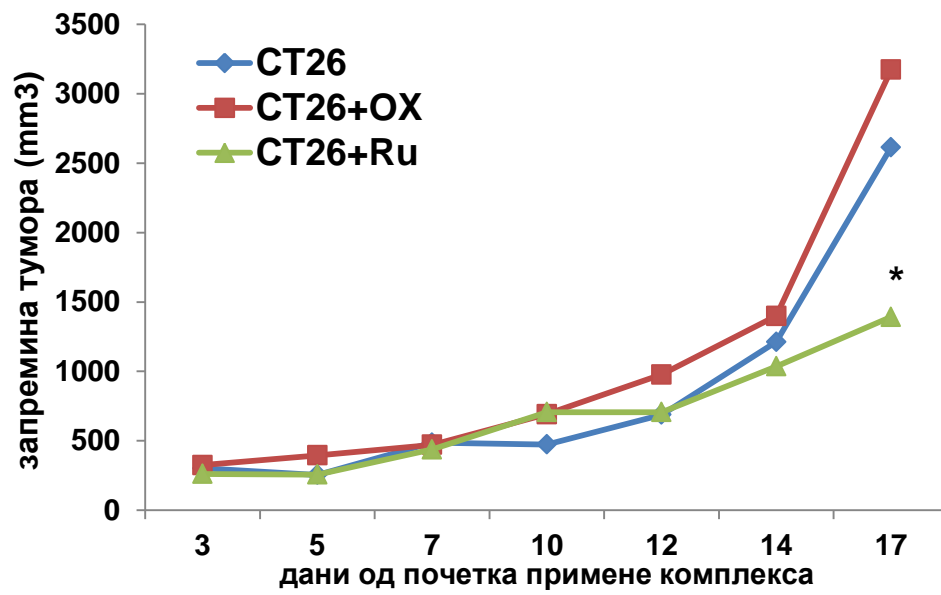
4.8.2. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује раст примарног тумора

Раст примарног тумора је праћен свакодневно и величина тумора је свакодневно мерена. Као што се види на графикону 25А запремина примарног тумора у групи мишева који су примали рутенијум се од 14. дана по почетку примене комплекса смањује, а 17. дана после примене комплекса је статистички значајно мања у поређењу са запреминама тумора у групама мишева који су примили само туморске ћелије и мишева који су након примене туморских ћелија примали оксалиплатину. Примена оксалиплатине није смањила запремину примарног тумора уколико се пореди са групом која није третирана после трансплантације туморских ћелија.

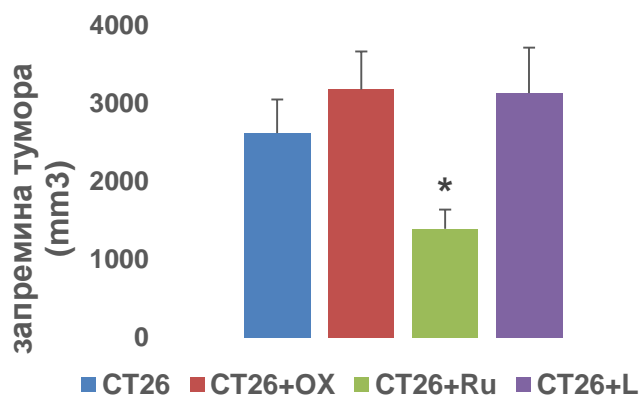
Запремине и масе тумора су мерене и по жртвовању мишева 21 дан од почетка примене испитиваних сусптанци. Примена комплекса рутенијума је статистички значајно смањила запремину и масу тумора у поређењу са све три групе (мишеви који су примили само туморске ћелије, мишеви који су после трансплантације туморских ћелија примали оксалиплатину и мишеви који су после трансплантације туморских ћелија примали лиганд), графикон 25Б и 25В.

Графикон 25.

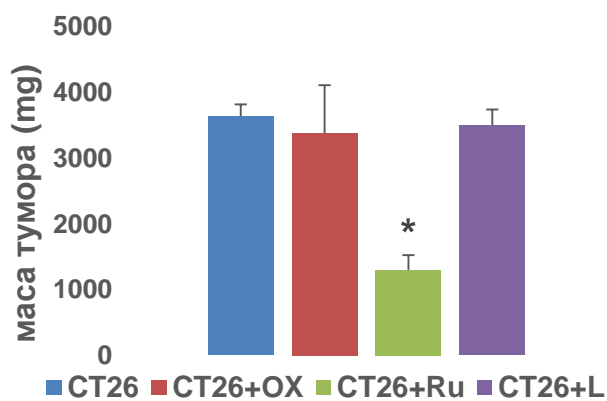
А



Б



В

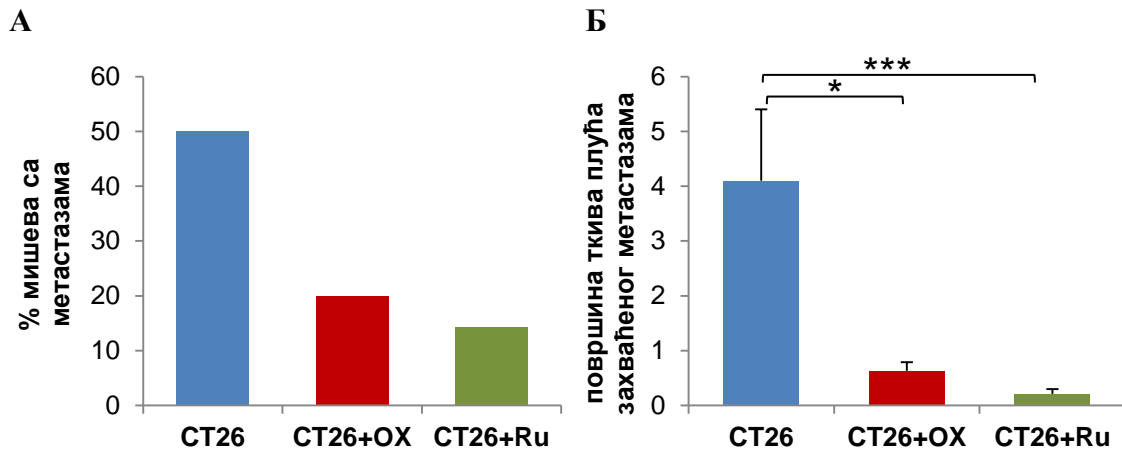


Графикон 25. Комплекс рутенијума смањује раст примарног тумора. Мишеви су примили субкутано СТ26 ћелије и од осмог дана су примали или комплекс рутенијума, или оксалиплатину или физиолошки раствор. Две групе мишева су примале само комплекс рутенијума или оксалиплатину, без претходне примене туморских ћелија. А) Криве приказује запремину тумора по групама, свакодневно, од почетка примене испитиваних супстанци; Б) график приказује запремину тумора по групама 21 дан од почетка примене испитиваних супстанци; В) график приказује масу тумора по групама 21 дан од почетка примене испитиваних супстанци. * $P < 0.05$ у односу на СТ26, СТ26+ОХ и СТ26+L групу.

4.8.3. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује метастазирање примарног тумора

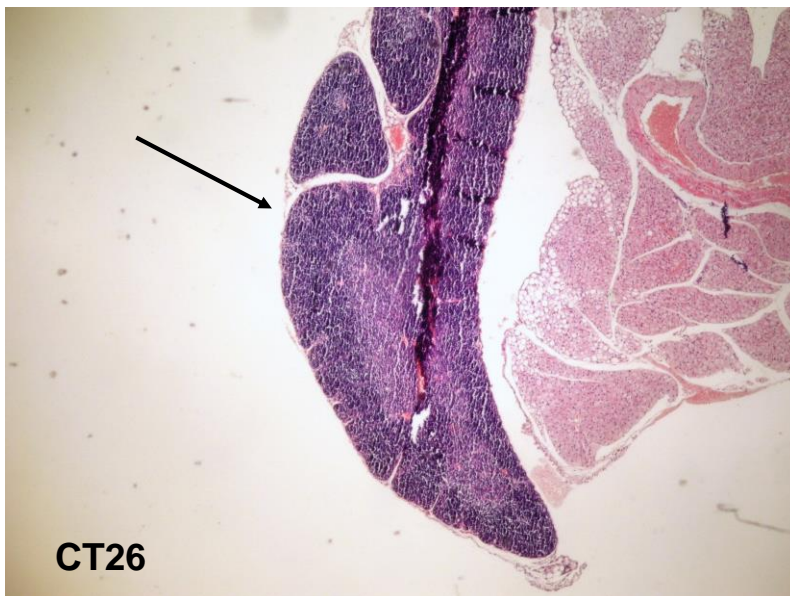
Мишеви су жртвовани четири недеље након апликације туморских ћелија и присустви и величина метастаза је анализирана на препаратима плућа и јетре (10 серијских пресека) обојени хематоксилин еозином.

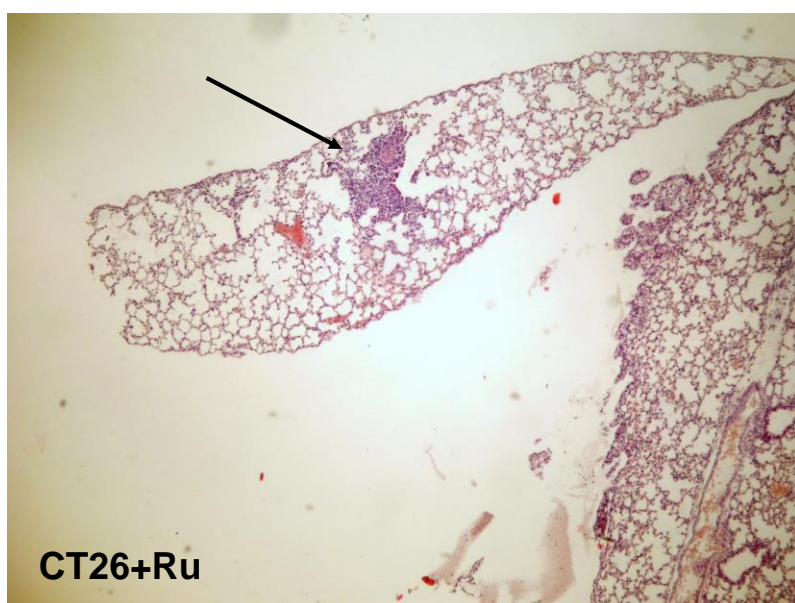
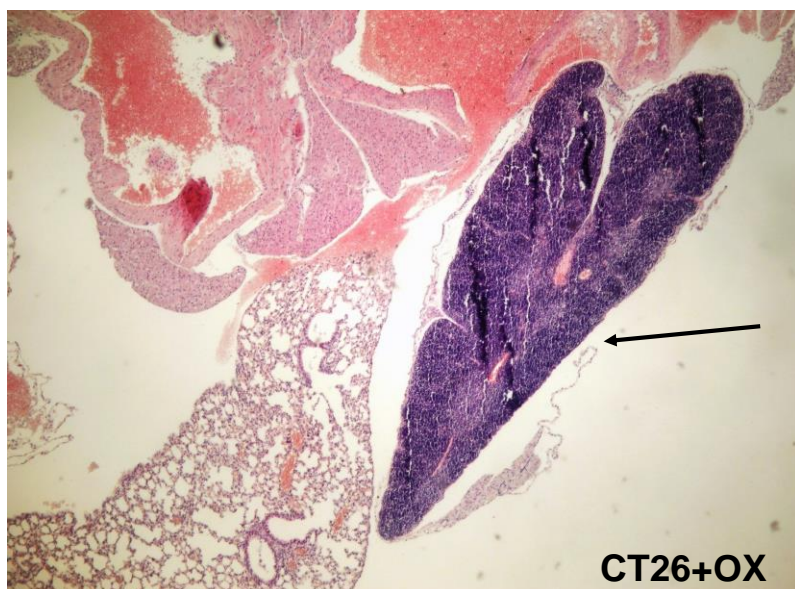
Резултати хистолошке анализе плућа су показали да комплекс рутенијума смањује инциденцу метастаза у плућима (Графикон 26А). Процент мишева који су развили метастазе у плућима у групи која је примала рутенијум је 14,38, док је тај проценат у групи која је примала оксалиплатину 20%. Половина мишева који након трансплантације туморских ћелија нису примали терапију је развила метастазе у плућима (Графикон 26А). Анализа површине ткива плућа захваћеног метастазама је указала да комплекс рутенијума не само да смањује инциденцу метастазирања, него смањује и површину метастаза. Као што се види на слици 4 метастаза коју је у плућима развио миш који је примао комплекс рутенијума захвата веома малу површину, у поређењу са метастазам које су развили мишеви који нису примали терапију или који су примили оксалиплатину, а код којих метастазе захватају читаве режњеве плућа. Средња вредност површине плућног ткива захваћеног метастазама у групи СТ26+Ru је статистички значајно мања ($p < 0.001$) у поређењу са СТ26 групом, али и у поређењу са СТ26+ОХ групом ($p < 0.05$) (Графикон 26Б).



Графикон 26. Комплекс рутенијума смањује појаву и површину метастаза у плућима. Мишеви су примили субкутано CT26 ћелије и од осмог дана су примали или комплекс рутенијума, или оксалиплатину или физиолошки раствор. А) инциденца метастазирања у плућима; Б) површина ткива плућа захваћеног метастазама 21 дан од почетка примене испитиваних супстанци. Статистичка значајност разлике међу наведеним групама је одређена Student-овим *t* тестом * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Слика 21

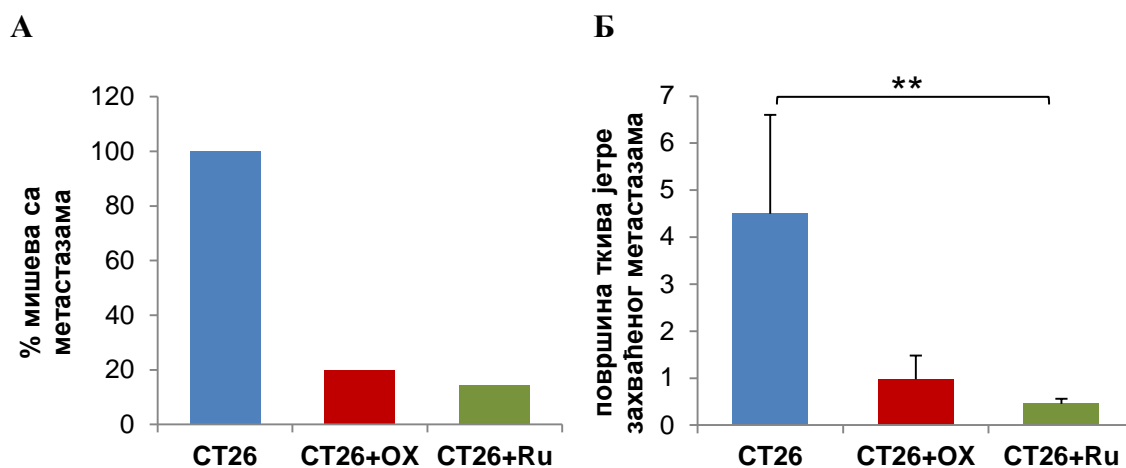




Слика 21. Репрезентативни исечци плућа обојених хематоксилином и еозином 28 дана након трансплантације туморских ћелија

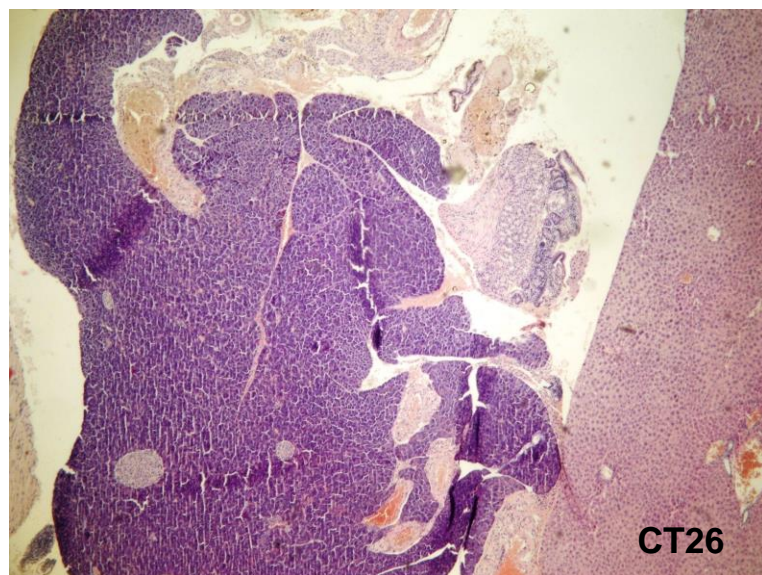
Налази добијени анализом исечака јетре су слични налазима анализе ткива плућа. Комплекс рутенијума је смањио инциденцу метастазирања у јетри (Графикон 27А). Сви мишеви којима су СТ26 ћелије апликоване субкутано, а који нису примали никакву терапију су развили метастазе у јетри (100%), на супрот 20% мишева санметастазам у јетри који су примали оксалиплатину и само 14,28 мишева са метастазама у јетри у групи која је примала комплекс рутенијума (Графикон 27А). Такође површина ткива јетре захваћеног метастазама је најмања у групи која је примала рутенијум, статистички значајно мања ($p < 0.005$) у поређењу са групом која је примила само туморске ћелије

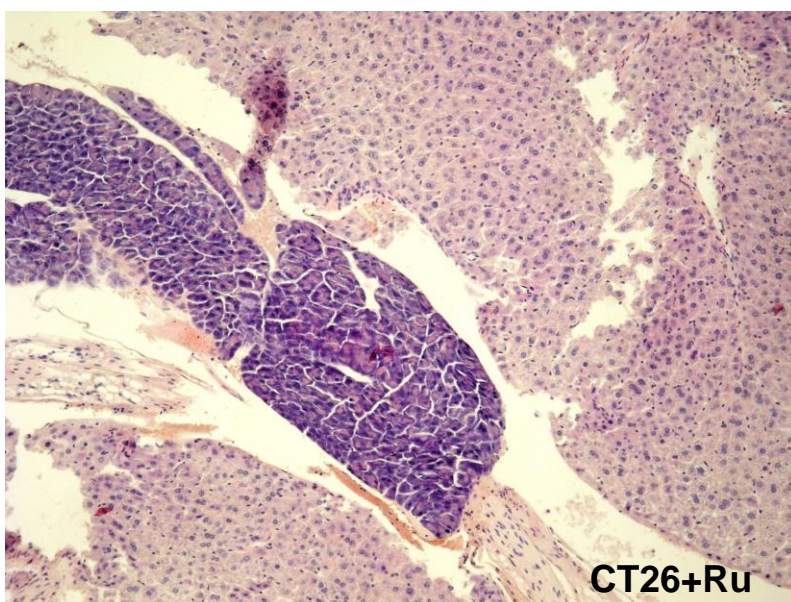
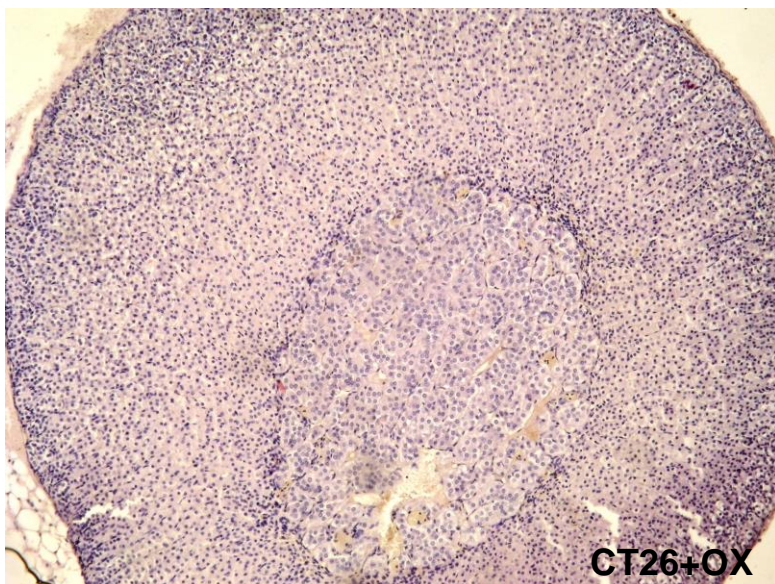
(Графикон 27Б). Нама статистички значајне разлике у површини ткива јетре захваћеног метастазама у међу групама CT26+OX и CT26+Ru.



Графикон 27. Комплекс рутенијума смањује појаву и површину метастаза у јетри. Мишеви су примили субкутано CT26 ћелије и од осмог дана су примали или комплекс рутенијума, или оксалиплатину или физиолошки раствор. А) инциденца метастазирања у јетри; Б) површина ткива јетре захваћеног метастазама 21 дан од почетка примене испитиваних супстанци. Статистичка значајност разлике међу наведеним групама је одређена Student-овим *t* тестом $**p < 0.005$.

Слика 22

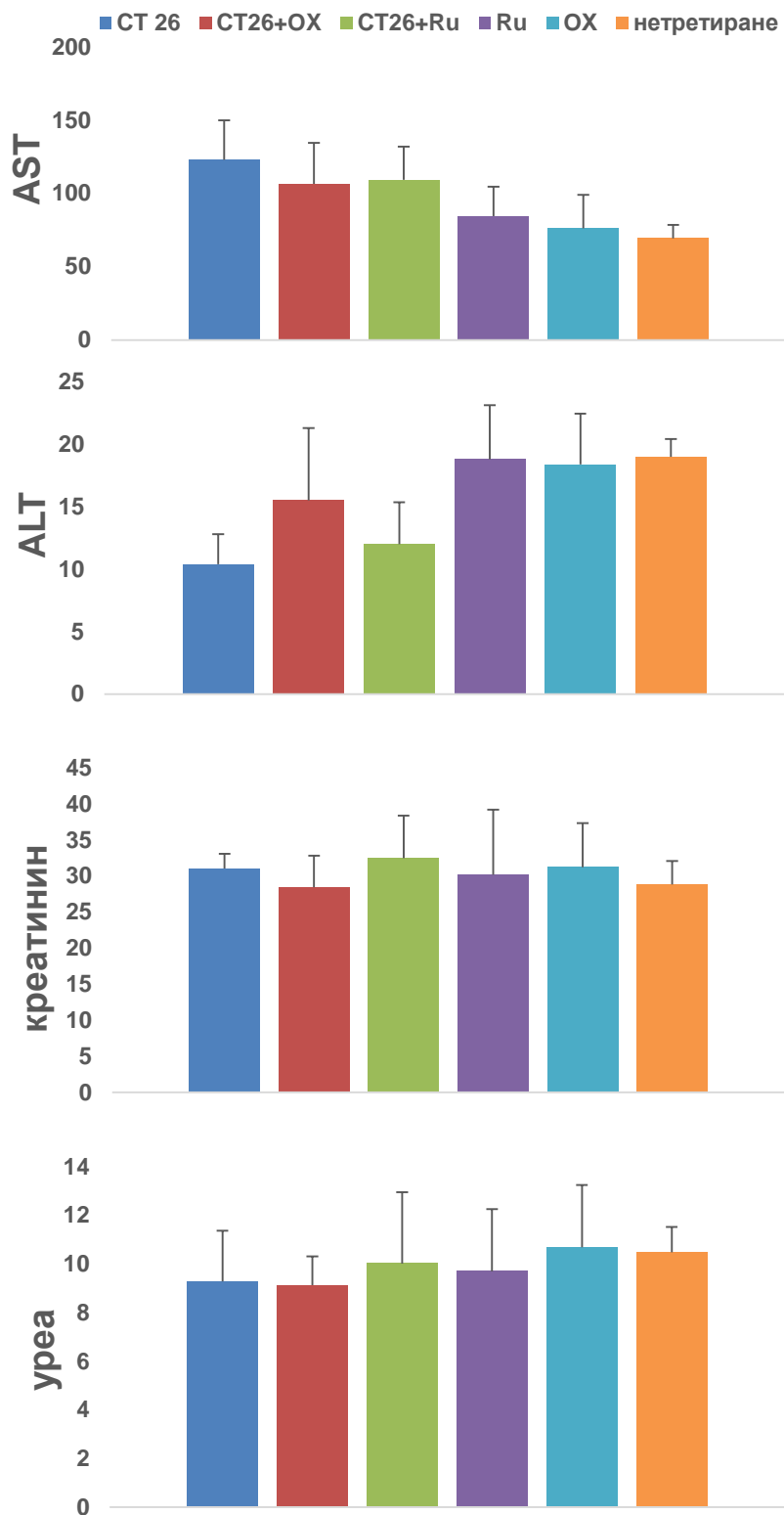




Слика 22. Репрезентативни исечци јетре обојених хематоксилином и еозином 28 дана након трансплантације туморских ћелија

4.8.4. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс не испољава токсичност

Токсичност комплекса рутенија је процењена мерењем трансаминаза, урее и креатинина у серуму 21 дана од почетка примене. Анализиране су вредноси у групама које су само примале комплекс рутенијума или само оксалиплатину и у групама које су наведене супстанце примале после трансплантације туморских ћелија. Резултати указују да комплекс рутенијума не испољава хепато- и нефро- токсичност (Графикон 28). Међу испитваним групама нема статички значајне разлике у вредностима АСТ, АЛТ, урее и креатинина у серуму.



Графикон 28. Комплекс рутенијума не испољава хепато- и нефро- токсичност. Концентрације AST, ALT, урее и креатинина су мерене у серуму добијеном 21 дан од почетка примене испитиваних суспензија у наведеним групама мишева. Статистичка значајност разлике међу наведеним групама је одређена Student-овим *t* тестом, нема статистички значајне разлике међу групама.

Анализа броја појединих популација ћелија имунског система у јетри је указала да рутенијум не испољава ни хематотоксичност. Међу групама нема разлике у броју изолованих CD4+ и CD8+ Т лимфоцита, CD19+ В лимфоцита, CD11c+ дендритских ћелија, НК ћелија и F4/80+ макрофага (Графикон 29).



Графикон 29. Комплекс рутенијума не испољава хематотоксичност. Спленоцити изоловани 21 дан после примене испитиваних супстанци су анализирани проточном цитометријом и израчунат је апсолутни број CD4+ и CD8+ Т лимфоцита, CD19+ В лимфоцита, CD11c+ дендритских ћелија, НК ћелија и F4/80+. Приказане су средње вредности испитиваних популација по групи. Статистичка значајност разлике међу наведеним групама је одређена Student-овим *t* тестом, нема статистички значајне разлике међу групама.

5. ДИСКУСИЈА

Висока инциденца малигнух болести на глобалном нивоу и тренд брзог пораста броја новооболелих су разлози за стална истраживања у циљу развоја потенцијалних антитуморских лекова. Лекови на бази метала су кључни у системској терапији против рака још од открића антитуморске активност цисплатине шездесетих година прошлог века (265). Трећа генерација антитуморских лекова на бази платине, оксалиплатина, одобрена је 2004. године као стандардни хемотерапеутик у лечењу узнапредовалог колоректалног карцинома, у комбинацији с 5-флуороурацилом и леуковорином (FOLFOX). (266) Иако цисплатина и њени деривати показују ефикасно антитуморско дејство против већине карцинома, постоје озбиљна ограничења у примени ових лекова. Разлог су токсично дејство препарата платине на неканцерске ћелије и системски нежељени ефекти који се код пацијентата најчешће манифестују периферном неуропатијом, дигестивним тегобама, алопецијом и миелотоксичним ефектима. Бројна нежељена дејства и развој резистенције на антитуморске лекове базиране на платини условили су дизајнирање нових *non-platinum* антитуморских лекова међу којима комплекси рутенијума заузимају значајно место. (267)

Први комплекс рутенијума одобрен за примену у клиничким истраживањима је NAMI-A синтетисан од стране *Alessio-ове* групе. NAMI-A поседује повољне биолошке и хемијске карактеристике (добра антиметастатска активност, ниска општа токсичност, лака и репродуктивна припрема, добра стабилност), а резултати прве фазе испитивања указују на добру подношљивост лека, без неочекиване токсичности. Међутим, ниска терапијска ефикасност комплекса према примарном тумору и последична прогресија болести (доказано у првој фази клиничких испитивања), те парцијално дејство лека (изузетно антиметастатско али не и антитуморско- резултати II и III фазе испитивања) ограничили су његову даљу клиничку употребу. Комплекс рутенијума KP1019, дизајниран од стране *Kepler-ове* групе је такође ушао у фазу клиничких испитивања и његов боље растворљив облик KP1339 их тренутно пролази. (267)

5.1. Синтеза и карактеризација рутенијум(II) терпиридин комплекса

Монофункционални рутенијум(II) комплекси опште формуле $[Ru(L_3)(N-N)X]_n$ фацијалне геометрије су широко истраживани у погледу антитуморске активности, док

су комплекси са меридијалном геометријом скоро потпуно занемарени. Типичан тридентатни лиганд који се координује у меридијалном положају за јон метала је терпиридин. Већина рутенијум(II) терпиридин комплекса, која има такође и *N-N* полипиридил лиганд (нпр. *bpy*), има веома ниску растворљивост у воденом раствору, што ограничава биолошки релевантна истраживања. Овај проблем је довео до смањеног интересовања у области антиканцерогене активности *mer* комплекса у односу на комплексе фацијалне геометрије. Имајући то у виду, било је од значаја усмерити испитивања ка синтези и карактеризацији рутенијум(II) терпиридин комплекса меридијалне геометрије и њиховој интеракцији са ДНК нуклеобазама. Синтетизована је серија рутенијум(II) комплекса опште формуле $mer-[Ru(L_3)(N-N)X][Y]_n$, где је L_3 *tru* или *Cl-tru* (4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин), *X* је *Cl* или *dmsO-S*, *N-N* је бидентатни хелатни лиганд који има способност водоничног везивања са нуклеобазама (*N-N* = *en* или *dach*), *Y* је *Cl*, PF_6 или CF_3SO_3 , *n* = 1 или 2 у зависности од природе лиганда *X*. (252)

Бидентатни хелатни лиганди, *en* и *dach*, изабрани су ради побољшања растворљивости њихових комплекса у води, као и због њихове способности за формирањем водоничних веза са координованим нуклеобазама. Ради поређења направљен је и одговарајући $Ru(Cl-tru)$ комплекс са *N-N* = *bpy*. Такође, синтетисали смо и $Ru(Cl-tru)$ комплекс са *N-O* = *pic*. Фокусирали смо се углавном на *Cl-tru* деривате, због присуства *Cl* који може учествовати у формирању додатних водоничних веза, као што су $O-H \cdots Cl$, $N-H \cdots Cl$, $C-H \cdots Cl$, затим са протеинима и ДНК. (252)

Сви комплекси су карактерисани помоћу 1D (1H и ^{13}C) или 2D ($^1H-^1H$ COSY, $^1H-^{13}C$ HSQC и $^1H-^{13}C$ HMBC) NMR и IR спектроскопије, UV-Vis спектрофотометрије и елементалне анализе. Резултати рендгенске структурне анализе су показали да комплекси имају типичну издужену октаедарску структуру, који садрже тридентатни *Cl-tru* или *tru* лиганд у очекиваном меридијалном положају, *N-N* бидентатни хелатни лиганд и шесто место окупирано је јоном хлора. (252)

5.2. UV-Vis испитивање реакције комплекса 1 и 2 са аминокиселином L-хистидин

Последњих година велики број истраживања је усмерен ка испитивању интеракција рутенијум(II/III) комплекса са серум протеинима и аминокиселинама које садрже сумпор. Ове интеракције су веома важне јер након интравенског уношења комплекса рутенијума, протеини плазме постају потенцијалне мете за координовање

рутенијум(II/III) комплекса. Експериментални подаци прикупљени до сада пружају информацију о нижој реактивности аминокиселина и протеина према рутенијум(II) комплексима. (242) Релативно слаба веза аминокиселина и протеина са овим комплексима може бити одговорна за транспорт и допремање комплекса рутенијума до канцерогених ћелија, односно неке аминокиселине, пептиди и протеини могу да служе као резервоари рутенијума. Ово може бити и узрок мањих споредних нежељених ефеката комплекса рутенијума у односу на комплексе платине.

Имајући у виду да су ове интеракције од изузетне важности за разумевање механизма антитуморске активности комплекса рутенијума, у овој Докторској дисертацији проучавали смо реакције рутенијум(II) терпиридин комплекса са аминокиселином L-хистидин. Структурне формуле $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (**1**) и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (**2**) комплекса су већ приказане у одељку 4.1. (Слика 15). Кинетика супституционих реакција комплекса **1** и **2** са L-хистидином (L-His) испитивана је спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. (253)

5.3. Интеракције комплекса са ДНК

Многи Ru(II) полипиридил комплекси су добро познати ДНК интеркалатори са релативно ниском токсичношћу, што их чини идеалним за примену у дијагностици. С друге стране, Ru(II) комплекси који садрже лабилне лиганде (као што је Cl⁻), након хидролизе могу се везати ковалентно за ДНК преко N7 атома гуанина.

Електронска апсорпциона спектроскопија једна је од најважнијих метода за одређивање начина везивања комплекса јона метала за ДНК. Повећање интензитета апсорпционих максимума који одговарају MLCT прелазима за оба комплекса указује на чињеницу да постоји директно формирање новог једињења са ДНК хеликсом. (253) Осим тога, појава црвеног померања (батохромни ефекат) за оба комплекса указује на стабилизацију ДНК дуплекса. Потврђено је да се Ru(II)-tpy комплекси, $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**1**) и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]\text{Cl}$ (**2**) (Слика 15), могу везати за ДНК на два начина, путем интеркалације и ковалентно преко N7 гуанина. Комбинација ових интеракција може се користити за побољшање афинитета везивања и селективности комплекса рутенијума. Такође, оба комплекса садрже N-донорске лиганде који су способни да формирају специфичне водоничне везе. Добијени резултати су у

сагласности са резултатима који су добијени за антиканцерогене Ru(II)-арена комплексе. (240)

Добијене вредности K_b указују на снажно везивање комплекса за ДНК, при чему комплекс **1** ($1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) показује већи афинитет везивања за ДНК у односу на комплекс **2** ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Међутим, K_b вредности комплекса **1** и **2** су мање у односу на класични интеркалатор етидијум-бромид (ЕБ), чији је афинитет везивања за ДНК $1,23 (\pm 0,07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Такође, испитивана је зависност интензитета емисије ЕБ везаног за ДНК у одсуству и присуству комплекса у функцији таласне дужине. (253) Додавање раствора комплекса **1** и **2** растућих концентрација (до $r = 1,0$) доводи до значајног смањења интензитета емисије на 612 nm, што указује на конкуренцију између комплекса и ЕБ при везивању за ДНК. Смањење интензитета флуоресценције ДНК-ЕБ комплекса указује на то да испитивани рутенијум комплекси **1** и **2** могу да истисну ЕБ из ЕБ-ДНК једињења и реагују са ДНК путем интеркалације.

Оба комплекса имају високе вредности *Stern-Volmer-ове* константе (Табела 17): $2,1 \times 10^4$ за **1** и $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ за **2**, указујући на њихову велику ефикасност да замене ЕБ и вежу се снажно за ДНК, што је у сагласности са високим вредностима константи везивања K_b добијених помоћу UV-Vis спектрофотометрије. Ове интеракције могу допринети јединственом начину везивања за ДНК и изазвати структурне деформације ДНК, које се разликују у односу на цисплатину.

Добијени резултати указују на присуство и ковалентног и нековалентног начина везивања за ДНК комплекса **1** и **2** након хидролизе. До сличних запажања за органометалне комплексе дошли су Садлер и његови сарадници, где је директно координационо везивање монофункционалног $[\text{Ru}(\eta^6\text{-biphenyl})(\text{en})\text{Cl}]^+$ комплекса за N7 атом гуанина употпуњено интеркалационим везивањем бифенил лиганда.

5.4. *In vitro* антиканцерогена активност комплекса 1 - 4

Комплекс **1** који има IC_{50} вредност између 32,80 и 66,30 μM , показује највећу антиканцерогену активност у поређењу са осталим комплексима (**2 - 4**), али је њихова цитотоксичност нижа у односу на цитотоксичност цисплатине при истим условима. Добијене IC_{50} вредности испитиваних комплекса повезане су са њиховом способношћу да хидролизују монодентатни лиганд. Заправо, оба Ru(II)-тру комплекса **1** и **2** брзо подлежу процесу хидролизе и формирању одговарајућих аква врста након растварања у

води, док су комплекси **3** и **4** веома инертни у воденом раствору. Цитотоксичност зависи такође и од природе инертног хелатног лиганда. Присуство етилендиамина у координационој сфери Ru(II)-тру комплекса је веома важно за цитотоксичну активност. Добијени резултати цитотоксичности слажу се са липофилним карактером ($\log P_{o/w}$) комплекса **1** и **2**.

Губитак цитотоксичности испитиваних комплекса према канцерогеним ћелијама примећен је када се *en* или *dach*, σ -донори, замене другим N-N хелатним лигандом (*bpy*) или N-O анјонским лигандом (*pic*), који представљају јаке π -акцепторе. Са структурне тачке гледишта, губитак активности ових деривата може потицати од одсуства $N_{(sp^3)}H$ група, за које је познато да стабилизују производе нуклеобаза помоћу јаке водоничне везе између NH групе етилендиамина и C60 гуанина. (240)

5.5. $[Ru(H_2L^{t-Bu})Cl_3]$ комплекс смањује вијабилност ћелија мишјег карцинома колона CT26 *in vitro*

У нашем експерименту је испитивана антитуморска активност новосинтетисаног комплекса рутенијума(III) који је због свог оксидационог стања инертнији у односу на одговарајуће комплексе рутенијума(II). Комплекси рутенијума(III) прво подлежу *in vivo* редукцији до мање инертног рутенијум(II) оксидационог стања, а затим долази до отпуштања хлоридо лиганда и стварања аква метаболита који је способан да се веже за биолошке мете. (207) Ови комплекси остају у релативно неактивном рутенијум(III) оксидационом стању све док не стигну до туморског ткива где је присутан нижи садржај кисеоника и рН, и повећана концентрација глутатиона (редукциони агенс) у односу на нормална ткива. У овим условима олакшана је редукција рутенијума(III) до рутенијума(II). Редокс потенцијал рутенијума је реверзибилан, па постоји могућност да се активан комплекс рутенијума(II) у нормално прокрвљеним ткивима са већом концентрацијом кисеоника, оксидује до инертног комплекса рутенијума(III). (208) Овај активациони пут може бити одговоран за селективну токсичност према канцерогеним ћелијама, као и за ефикасност према хипоксичним туморима који могу бити отпорни на хемотерапију и радиотерапију. Још једна важна особина комплекса рутенијума(III) је способност да замени гвожђе при везивању за многе биомолекуле, укључујући серум протеине (нпр. трансферин и албумин). Рутенијум се везује за трансферин, при чему настаје трансферин-рутенијумски комплекс који може бити активно транспортован у

туморска ткива на чијој се површини налази знатно већи број трансфериских рецептора у односу на здрава ткива. (209) Када се једном веже за трансферински рецептор, комплекс ослобађа рутенијум који се може лако интернализovati у тумор. (210) Верује се да је ово други узрок селективног деловања комплекса рутенијума према ћелијама канцера што доводи и до смањења споредних нежељених ефеката терапије. (202)

Антитуморски ефекат новосинтетисаног комплекса рутенијума је испитиван на ћелијским линијама мишјег карцинома колона СТ26 *in vitro* коришћењем МТТ теста. У експериментима је испитивана временски и дозно зависна цитотоксичност комплекса рутенијума. СТ26 ћелијска линија је култивисана 24 и 72 сата у двоструко растућим разблажењима комплекса почетне концентрације 500 μ М, а цитотоксичност је утврђивана индиректно, одређивањем процента вијабилних ћелија.

Резултати нашег истраживања су показали да је новосинтетисани комплекс рутенијума цитотоксичан за СТ26 ћелијску линију мишјег карцинома колона и да своју активност испољава и након 24 и након 72 сата излагања ћелијске линије испитиваној супстанци. Концентрација испитиваног комплекса рутенијума потребна да смањи вијабилност ћелија мишјег карцинома колона за 50% после 24 и након 72 сата излагања износила је $50,81 \pm 7,15$, односно $7,49 \pm 1,98$. Цитотоксичност новосинтетисаног комплекса рутенијума је поређена са цитотоксичним ефектом стандардног хемотерапеутика, оксалиплатине, за коју је се зна да испољава антитуморски ефекат на ћелијама карцинома колона, и лиганда који је коришћен за грађење комплекса рутенијума. Концентрација оксалиплатине потребна да смањи вијабилност СТ26 ћелија за 50% је после 24 сата излагања износила је $97,12 \pm 16,22$, а после 72 сата $3,69 \pm 1,01$. Концентрације лиганда потребна да смањи вијабилност СТ26 ћелијске линије мишјег карцинома колона за исти проценат је после 24 сата износила $146,16 \pm 20,87$, односно $33,76 \pm 7,19$ после 72 сата.

Поређењем IC_{50} вредности комплекса рутенијума и контролних супстанци у оквиру дејства на туморске ћелије мишијег карцинома колона СТ26 можемо закључити да постоји временски и дозно зависна цитотоксичност испитиваног комплекса. Комплекс рутенијума са повећањем трајања периода инкубације има ефикаснији цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије; односно, потребне су значајно мање концентрације овог комплекса да смањи вијабилност туморских ћелија на 50% након 72 часа излагања, у поређењу са концентрацијама које су потребне да смање вијабилност

на 50% у оквиру 24- часовне инкубације. Поред тога, у оквиру 24-часовног излагања туморских ћелија дејству испитиваних супстанци потребна је скоро дупло мања концентрација новосинтетисаног комплекса рутенијума у односу на концентрацију оксалиплатине да би дошло до смањења вијабилности СТ26 ћелија за 50%. Концентрација лиганда потребна за смањење вијабилности туморских ћелија на 50% након 24 сата излагања у поређењу с концентрацијом комплекса рутенијума за исти ефекат је значајно већа, док је у нижим дозама (већим разблажењима) слична ефективним концентрацијама оксалиплатине. Концентрација новосинтетисаног комплекса рутенијума и оксалиплатине потребна за смањење вијабилности туморских ћелија на 50% након 72 сата излагања туморских ћелија испитиваним супстанцама је значајно мања у односу на концентрације потребне за постизање истог ефекта у оквиру 24-часовне инкубације и по вредностима је слична, док су концентрације лиганда потребне за исти ефекат вишеструко веће.

Може се закључити да испитивани комплекс рутенијума у оквиру 24-часовне инкубације, у односу на контролне супстанце, има најефикаснији цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије. Израчунате IC_{50} концентрације за комплекс рутенијума су скоро дупло ниже од IC_{50} концентрације оксалиплатине и скоро три пута мање у односу на IC_{50} концентрације лиганда при истој дужини трајања третмана. Поредећи IC_{50} вредности испитиваног комплекса рутенијума за период 24 сата према периоду од 72- часовне инкубације, може се закључити да је у краћем временском периоду излагања за жељени цитотоксични потенцијал испитиване супстанце неопходна већа доза комплекса, те да су у дужем периоду излагања за исте ефекте потребне значајно мање дозе испитиване супстанце. Цитотоксичност комплекса рутенијума и оксалиплатине након 72 сата излагања је скоро идентична; IC_{50} вредности за поменуте супстанце се значајно смањују и веома се мало разликују ($7,49 \pm 1,98$ vs $3,69 \pm 1,01$). Цитотоксичност лиганда је у оквиру 24-часовне инкубације у односу на цитотоксичност комплекса рутенијума значајно мања и слична је цитотоксичном потенцијалу оксалиплатине за разблажења већа од $31,25 \mu\text{M}$. IC_{50} вредност за лиганд након 72 сата излагања је вишеструко већа у поређењу са вредностима за комплекс рутенијума и оксалиплатину, што директно указује на његов мањи цитотоксични потенцијал у односу на остале испитиване супстанце.

Цитотоксичност комплекса рутенијума је испитивана у бројним студијама али новосинтетисани комплекс $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ до сада није коришћен. Међутим, резултати претходних истраживања у којима је проучаван цитотоксични потенцијала сличних комплекса рутенијума, може послужити за компарацију с нашим резултатима.

У нашем ранијем раду чије смо резултате публиковали 2016. године (253) испитивали смо цитотоксичност четири рутенијум (II) терпиридинских комплекса на ћелијским линијама хуманог карцинома плућа (A549) и дебелог црева (HCT116), као и на ћелијама мишијег карцинома колона СТ26. Цитотоксични потенцијал комплекса рутенијума је одређиван МТТ тестом, а за потребе поређења је упоредо одређивана цитотоксичност цисплатине. Том приликом смо утврдили да цитотоксичност испитиваних комплекса рутенијума зависи од примењене дозе испитиваних супстанци, односно да је преживљавање туморских ћелија смањено с повећањем концентрације комплекса рутенијума, што је у складу с резултатима нашег актуелног експеримента. IC_{50} вредности испитиваних комплекса из нашег ранијег експеримента после 72 сата излагања ћелијске линије мишијег карцинома колона СТ26 биле су (по комплексима 1; 2; 3; 4; изражене у μM) 32.80 ± 0.10 ; 72.80 ± 0.20 ; >250 ; >1000 . Поредити IC_{50} вредности актуелно испитиваног новосинтетисаног комплекса $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ ($7,49 \pm 1,98$) с наведеним, у истом периоду инкубације (72 сата), можемо закључити да је цитотоксични потенцијал актуелно испитиваног комплекса рутенијума вишеструко већи.

Упркос чињеници да су последњих година синтетисана бројна једињења базирана на комплексима рутенијума, механизам њихове активности је и даље недовољно јасан. Ова чињеница отежава дизајнирање нових антиканцерогених лекова на бази ових комплекса. Недавно је развијен нови приступ у синтетисању комплекса рутенијума где је један или више полипиридилских лиганата око централно постављеног рутенијума модификовано органским молекулима са познатим биолошким ефектом и механизмом деловања. Очекивани бенефит се односи на подешавање липофилности комплекса рутенијума ради боље акумулације у ћелијским органелама (митохондрије, ендоплазматски ретикулум, ћелијско једро, лизозоми); могућност испољавања активности преко одређених ћелијских рецептора, ензима или ћелијских процеса; акумулација комплекса зависна од кисеоника у ћелијама итд. (268)

Резултати нашег експеримента показују да је цитотоксични потенцијал лиганда који је коришћен за грађење испитиваног комплекса рутенијума значајно мањи у односу на цитотоксичност самог комплекса. Израчунате IC_{50} вредности лиганда су значајно веће и након 24 и након 72 сата излагања. *Lomzik* и сарадници (268) су 2017. године презентовали резултате својих испитивања који указују на значајну улогу помоћних лиганда у подешавању биолошке активности комплекса рутенијума. Испитивали су цитотоксичност два нова рутенијум(II) полипиридинска комплекса на ћелијским линијама хуманог карцинома плућа (A549) и ћелијским линијама мишијег карцинома колоне (CT26), поредећи цитотоксичне ефекте испитиваних супстанци са њиховим цитотоксичним потенцијалом после модификације једног бипиридинског лиганда биолошки активним органским супституентом *semicarbazone 2-formylpyridinom*. Резултати експеримента показују да комплекс рутенијума који садржи модификовани лиганд има израженији цитотоксични ефекат. Израчунате IC_{50} вредности за ћелијску линију CT26 у експерименту *Lomzik-a* су за први комплекс рутенијума износиле 233 ± 38 после 24 сата излагања, односно 50 ± 7.6 после 72 сата инкубације што показује временску и дозну зависност цитотоксичног потенцијала испитиване супстанце што је потврђено и у нашем истраживању. Поредећи IC_{50} вредности нашег комплекса рутенијума у истим интервалима инкубације ($50,81 \pm 7,15$ после 24 сата и $7,49 \pm 1,98$ после 72 сата излагања) можемо закључити да новосинтетисани комплекс рутенијума који смо испитивали има већи цитотоксични потенцијал. Наспрам тога, цитотоксичност другог комплекса рутенијума из експеримента *Lomzik-a* показује изразито већу цитотоксичност у односу на наш али само након 24 сата излагања (измерене IC_{50} вредности су 5.0 ± 0.1 , наспрам наших $50,81 \pm 7,159$), при чему је после 72 сата излагања наш комплекс показао већи цитотоксични потенцијал (измерене IC_{50} вредности су 21 ± 5 , наспрам наших $7,49 \pm 1,98$).

До сличних резултата су дошли *Mazuryk* и сарадници (269). Њихов рад је фокусиран на модификацији лиганда испитиваних би- и терпиридинских комплекса рутенијума у циљу подешавања карактеристика једињења ради промоције њихове антитуморске активности. Експеримент је подразумевао испитивање цитотоксичног потенцијала комплекса рутенијум-полипиридина (бипиридин и терпиридин) после модификације лиганда супституентом (пиридин) на ћелијске линије аденокарцином плућа (A549) и мишијег карцинома колоне (CT26). Цитотоксични ефекат

модификованих комплекса рутенијума је одређиван израчунавањем IC_{50} вредности након 24 сата инкубације на $37^{\circ}C$. Утврђено је да сви супституисани комплекси имају вишеструко већи цитотоксични потенцијал него цисплатина. Комплекси рутенијума са више пиролидинских супституената су испољили већу цитотоксичну активност. Њихов антипролиферативни ефекат на ћелијску линију мишјег карцинома колона СТ26 је, презентован измереним IC_{50} вредностима, био у распону од оквирних 5,3- 5,5 μM , што указује на значајно већи цитотоксични потенцијал у односу на новосинтетисани комплекс рутенијума из нашег истраживања за исти период инкубације. Комплекс рутенијума са несупституисаним лигандом је, очекивано, имао маргиналну цитотоксичност како у односу на модификоване комплексе из експеримента *Mazuryk* и сарадника, тако и у односу на нашу испитивану супстанцу (>320 vs $50,81 \pm 7,15$). Такође, потврђено је и да цитотоксичност испитиваних би- и терпиридинских комплекса рутенијума зависи од редокс потенцијала и липофилности комплекса, што се у будућим истраживањима може узети у обзир за синтезу нових рутенијум комплекса са већом биолошком активношћу.

5.6. $[Ru(H_2L^{t-Bu})Cl_3]$ комплекс изазива апоптотску смрт СТ26 ћелија

На основу резултата *MTT* теста евидентно је да новосинтетисани комплекс рутенијума смањује вијабилност ћелијске линије мишјег карцинома колона СТ26, међутим поставља се питање којим типом ћелијске смрти испитивани комплекс индукује смрт туморских ћелија. Тип ћелијске смрти у нашем експерименту је анализиран методом проточне цитометрије након што су СТ26 ћелије после 24 сата излагања испитиваном комплексу, лиганду и оксалиплатини (концентрација $50\mu M$) обојене анексином V и пропидијум јодидом. Детектован је проценат ћелија у раној (анексин V+ пропидијум јодид-) и касној (анексин V+ пропидијум јодид-) апоптози, као и проценат некротичних ћелија у популацији туморских ћелија које су третиране наведеним супстанцама. Као контролне ћелије коришћене су нетретирани (гајене само у медијуму) СТ26 ћелије. Резултати су приказани као средња вредност за 3 понављања.

У контролној популацији нетретираних ћелија мишјег карцинома колона СТ26, 0,25% од укупног броја ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, односно 1,94% у

стадијуму касне апоптозе. Процент некротичних ћелија је био незнатан, свега 0,66%, док је, очекивано, највећи број ћелија сачувао вијабилност у високих 97,8%.

У популацији туморских ћелија које су третиране лигандом (концентрација 50 μM) после 24 сата излагања у стадијуму ране апоптозе било је 0,32%, а у стадијуму касне апоптозе 2,21% ћелија. Процент некротичних ћелија је износио 0,43%, а вијабилност је сачувало 97,4% ћелија.

Применом оксалиплатине у истој концентрацији (50 μM) након 24 часа инкубације СТ26 ћелија, њихова вијабилност је смањена на 94,6%. Наведена концентрација оксалиплатине је индуковала апоптозу у нешто више од 5% третираних ћелија при чему је 0,57% од укупног броја туморских ћелија било у стадијуму ране, а 4,09% у стадијуму касне апоптозе. Процентуални удео некротичних ћелија је износио 0,71%.

Новосинтетисани комплекс $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}})\text{Cl}_3]$ (концентрација 50 μM) је после 24 сата излагања смањио вијабилност туморских ћелија СТ26 за 11% (89,0% ћелија је сачувало вијабилност), од чега је проценат апоптотичних ћелија износио 10,53%, а некротичних 0,50%. Од процента апоптотичних ћелија 16,5% је било у стадијуму ране апоптозе, што је 1,74% од укупног броја третираних ћелија, односно 83,5% је било у стадијуму касне апоптозе што представља 8,79% од укупног броја СТ26 ћелија које су биле изложене инкубацији.

Тест апоптозе је показао да испитивани комплекс рутенијума индукује апоптотску смрт СТ26 ћелија (Графикон 20, Слика 19). Двадесетчетири сата након излагања комплексу рутенијума (концентрација 50 μM) већина мртвих ћелија (83,5%) је у касној апоптози (AnnexinV+PI+ ћелије). Процент апоптотичних СТ26 ћелија након излагања комплексу рутенијума је већи у поређењу са ефектом који је на СТ26 ћелије испољила оксалиплатина. Лиганд након 24 сата излагања СТ26 ћелија скоро и да не индукује апоптозу, проценат апоптотичних ћелија третираних лигандом је скоро исти као и проценат СТ26 ћелија које су спонтано ушле у апоптозу.

5.7. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс повећава проценат Noxa+ СТ26 ћелија

Како су досадашњи резултати показали да испитивани комплекс рутенијума смањује вијабилност и да индукује апоптотску смрт СТ26 ћелија, наредним

експериментом је у тертираним и контролним ћелијама испитана експресија протеина *Noxa* који учествује у индукцији и спољашњег и унутрашњег пута апоптозе.

Туморске ћелије СТ26 третиране испитиваним комплексом, лигандом и оксалиплатином (концентрација 50 μ M) и ћелија гајене само у медијуму (нетретиране контролне СТ26 ћелије) су обојене анти-*Noxa* антителом; проценат *Noxa*+ ћелија је детектован проточном цитометријом. Одређивана је средња вредност за *Noxa*+ ћелија у наведеним групама за 3 понављања. Статистичка значајност разлике у проценту *Noxa*+ ћелија међу наведеним групама је одређена *Student*-овим *t* тестом.

У контролној популацији нетретираних ћелија мишјег карцинома колона СТ26, 27,60% ћелија показује експресију *Noxa* протеина, што је незнатно мање у односу на *Noxa*+ СТ26 ћелије у групи која је третирана лигандом (28,57%). Туморске ћелије које су биле изложене дејству стандардног хемотерапеутика оксалиплатине показују убедљиво највиши степен експресије овог протеина (41,63% *Noxa*+ ћелија) у односу на 34,87% *Noxa*+ ћелија у групи која је третирана испитиваним комплексом рутенијума.

Као што се види на графикону 3 проценат СТ26 ћелија које експримирају *Noxa* протеин је статистички значајно већи у групи СТ26 ћелија третираних комплексом рутенијума у поређењу са групом нетретираних ћелија. Излагање СТ26 ћелија оксалиплатини је такође праћено значајним повећањем проценат *Noxa* позитивних ћелија у односу на контролу. Процент *Noxa*+ СТ26 ћелија након третирања оксалиплатином је већи него проценат *Noxa*+ ћелија након излагања комплексу рутенијума, али ова разлика није статистички значајна. Излагање СТ26 ћелија лиганду не повећава проценат ћелија које експримирају протеин *Noxa* (Графикон 21А). На графикону 21Б је приказан репрезентативни хистограм који приказује већи проценат *Noxa*+ ћелија након третирања комплексом рутенијума и оксалиплатине у поређењу са нетретираним ћелијама (линије хистограма за комплекс рутенијума и оксалиплатине су померено удесно у односу на линију која приказује нетретиране СТ26 ћелије).

5.8. [Ru(H₂L^{t-Bu})Cl₃] комплекс смањује метастазирање примарног тумора

Антиметастатска активност комплекса рутенијума је запажена почетком осамдесетих година прошлог века (270), а најзначајнији резултати испитивања њиховог антиметастатског потенцијала су постигнути с комплексима NAMI и NAMI-A. (227b)

NAMI-A је успешно прошао прву фазу клиничких испитивања с доказаним дејством на настанак и раст плућних метастаза појединих малигнух тумора код експерименталних животиња. Bergamo и сарадници су 1999. године испитивали ефекте NAMI-A на туморске ћелије култивисане *in vitro*, и на метастазе тумора *in vivo*. У експерименту су коришћени лабораторијски мишеви код којих су индуковани тумори који доказано метастазирају у плућа (*MCa mammary carcinoma*, *Lewis lung carcinoma(LLC)* , *TS/A adenocarcinoma*). Као референтна супстанца с доказаним антитуморским и цитотоксичним дејством коришћена је цисплатина. Ефекти испитиваног комплекса NAMI-A су били потпуно атипични. Испитивани комплекс рутенијума је показао исту или бољу антиметастатску активност у односу на цисплатину и практично никакву цитотоксичност у *in vitro* условима. Смањење броја и величине плућних метастаза у експерименталном моделу *TS/A* мишјег карцинома дојке је било једнако антиметастатским ефектима цисплатине, упркос чињеници да је само цисплатина изазвала значајно смањење раста примарног тумора за читавих 32%. У експерименталном метастатском моделу Луисовог карцинома плућа, после уклањања примарног тумора, ефекти NAMI-A су били значајно бољи у односу на цисплатину. Ефекти испитиване супстанце су у експерименталном моделу *MCa* мишјег карцинома дојке довели до статистички значајног повећања очекиваног периода преживљавања који се могао поредити с резултатима цисплатине. Истовремено, цисплатина је била много токсичнији од NAMI-A што је доказано хистолошком анализом бубрега, плућа и јетре експерименталних мишева. Bergamo и сарадници су закључили да је NAMI-A за разлику од цисплатине, снажан агенс за лечење метастаза солидних тумора, као и за њихов третман у фази активног раста. Антиметастатски потенцијал NAMI-A који није повезан са директним цитотоксичним дејством на примарни тумор није недостатак већ предност због значајно мање токсичности за домаћина. (271)

Антиметастаски потенцијал новосинтетисаног комплекса рутенијума $[Ru(H_2L^{t-Bu})Cl_3]$ је испитиван у *in vivo* условима на експерименталним BALB/c мишевима који су субкутано примили СТ26 ћелије и од осмог дана су примали или комплекс рутенијума, или оксалиплатину или физиолошки раствор. Мишеви су жртвовани четири недеље након апликације туморских ћелија и присуство и величина метастаза је анализирана на препаратима плућа и јетре (10 серијских пресека) обојених хематоксилин еозином.

Резултати хистолошке анализе плућа су показали да испитивани комплекс рутенијума смањује инциденцу плућних метастаза (Графикон 26А). Процент мишева који су развили метастазе у плућима у групи која је примала рутенијум је 14,28%, док је тај проценат у групи која је примала оксалиплатину 20%. Половина мишева који након трансплантације туморских ћелија нису примали терапију је развила метастазе у плућима (Графикон 26А). Анализа површине ткива плућа захваћеног метастазама је указала да испитивани комплекс рутенијума не само да смањује инциденцу метастазирања, него смањује и површину ткива захваћеног метастазама. Као што се види на слици 21 метастаза коју је у плућима развио миш који је примао комплекс рутенијума захвата веома малу површину, у поређењу са метастазама које су развили мишеви који нису примали терапију или који су примили оксалиплатину, а код којих метастазе захватају читаве режњеве плућа. Средња вредност површине плућног ткива захваћеног метастазама у групи СТ26+Ru је статистички значајно мања ($p < 0.001$) у поређењу са СТ26 групом, али и у поређењу са СТ26+ОХ групом ($p < 0.05$) (Графикон 26Б).

Налази добијени анализом исечака јетре су слични налазима анализе ткива плућа. Комплекс рутенијума је смањио инциденцу метастазирања у јетри (Графикон 27А). Сви мишеви којима су СТ26 ћелије апликоване субкутано, а који нису примали никакву терапију су развили метастазе у јетри (100%), на супрот 20% мишева са метастазама у јетри који су примали оксалиплатину и само 14,28% мишева са метастазама у јетри у групи која је примала комплекс рутенијума (Графикон 27А). Такође површина ткива јетре захваћеног метастазама је најмања у групи која је примала рутенијум, и статистички је значајно мања ($p < 0.005$) у поређењу са групом која је примила само туморске ћелије (Графикон 27Б). Нама статистички значајне разлике у површини ткива јетре захваћеног метастазама међу групама СТ26+ОХ и СТ26+Ru.

Можемо закључити да су резултати испитивања антиметастатског потенцијала новосинтетисаног комплекса рутенијума у нашем експерименту у сагласности са литературним подацима. Комплекс $[Ru(H_2L^{t-Bu})Cl_3]$ испољава значајну антиметастатску активност, при чему посебно треба нагласити да истовремено, за разлику NAMI-A, у експерименталним *in vitro* условима испољава значајну цитотоксичност на ћелијске линије карцинома, а у експерименту *in vivo* истовремено смањује величину примарног

тумора, продужава преживљавање експерименталних мишева са примарним тумором и смањује број и величину метастаза.

5.9. [Ru(H₂L^{t-Bu})Cl₃] комплекс не испољава токсичност

Оксалиплатина се показала као значајан хемотерапеутик у лечењу колоректалног карцинома и има честу примену у онколошкој пракси. Истраживања су показала да примена оксалиплатине у комбинацији са другим хемотерапијским лековима (флуороурацил, леуковорин, бевацизумаб и капецитабин) код оболелих од колоректалног карцинома повећава укупну стопу преживљавања и продужава период преживљавања без прогресије болести. (272)

Међутим, поред доказаних бенефита, примена оксалиплатине је праћена бројним нежељеним терапијским ефектима. Најчешћи су периферна неуропатија, гастроинтестиналне тегобе и неутропенија. Подаци из литературе указују да чак 84,2 % пацијената с колоректалним карциномом коју су подвргнути терапијским протоколима с оксалиплатином имају знаке периферне неуропатије, најчешће сензорне. Мучнина, повраћање и дијареја су најчешћи знаци гастроинтестиналне токсичности лека и њихово присуство је утврђено у чак 53% пацијената са колоректалним карциномом који примају оксалиплатину. Код већине пацијената гастроинтестиналне тегобе имају бенигни ток. Ипак, *De Gramont* и сарадници су описали и један смртни случај услед гастроинтестиналне токсичности оксалиплатине. (273) Неутропенија, мукозитис, оштећење вида и слуха, дисфонија, панкреатитис и акутна бубрежна инсуфицијенција су такође описани нежељни ефекти терапије овим антитуморским агенсом. Оксалиплатина испољава и хепатотоксично дејство. Лек изазива хепатоцелуларне лезије и васкуларна оштећења јетре, укључујући синусоидну дилатацију, нодуларну хиперплазију и некрозу паренхима. Истраживања су показала да 57% пацијената с колоректалним карциномом који су лечени оксалиплатином има повишене вредности трансаминаза (AST, ALT) као индиректан показатељ оштећења хепатоцита. Васкуларна оштећења јетре узрокована оксалиплатином су, између осталог, доказана и хистопатолошком анализом материјала добијеног у оквиру постхемотерапијских ресекција јетре. Анализа ресектованих узорака указује на присуство синусоидне дилатације и крварење у чак 51%, и присуство перисинусоидне и вено-оклузивне фиброзе у 48% случајева. (274)

Бројна истраживања указују да комплекси рутенијума поред *in vitro* и *in vivo* доказаног антитуморског дејства, имају и значајно нижу системску токсичност од лекова на бази платине. (202) Alves de Souza и сарадници (275) су 2017. године презентовали резултате свог експеримента у коме су испитивали *in vivo* дејство новог рутенијум (II) комплекса на *Walker-256* карциному код пацова. Аутори су у оквиру експеримента, у групи здравих експерименталних животиња, учинили посебан осврт на процену системске токсичности испитиваног комплекса у односу на цисплатину. Дозе цисплатине које изазивају антитуморски ефекат код експерименталних животиња са индукованим *Walker-256* карциномом су код здравих пацова биле узрок губитка телесне масе, функционалних и структурних измене бубрега и јетре (хепаторенотоксични ефекат) и морталитета. Испитивани комплекс рутенијума, у дозама које испољавају антитуморске ефекте, у експерименту *Alves de Souza-e* и сарадника није изазвао нежељене ефекте терапије. Серумске вредности креатинина, урее, AST, ALT и AP су биле у границама физиолошких; није забележена промена у маси експерименталних животиња, као ни у маси њихових органа. Антитуморски ефекти без испољавања значајне токсичности су приписани доказаним антиоксидантним, антипролиферативним и антитуморским особинама рутенијум комплекса. (276, 277)

Wang и сарадници су испитивали антитуморски ефекат и системску токсичност новосинтетисаног комплекса рутенијума $[Ru(dmp)_2(ipad)](ClO_4)_2$ *in vivo* на ћелијским линијама хуманог карцинома јетре BEL7402 у моделу ксенографта код експерименталних BALB/c мишева. Претходна *in vitro* испитивања су показала да цитотоксични потенцијал њиховог комплекса показује дозну зависност. (278) Системски токсични ефекти код експерименталних животиња су такође били дозно зависни. Тачније, код BALB/c мишева су регистроване високе вредности креатинина, као последица оштећења бубрежне функције, тек када је примењена доза комплекса превазилазила 20 mg/kg. Експерименталне животиње су испољиле губитак у телесној маси и измењено држање, а каснија хистопатолошка анализа бубрежног паренхима мишева је показала атрофију бубрежних тубула и дегенерацију тубуларних ћелија. (279)

Комплекси рутенијума који су ушли у фазу клиничких испитивања код људи (NAMI-A, KP1019 I NKP1339) у поређењу са антитуморским лековима на бази платине

доказано испољавају релативно ниску системску токсичност. (280) Доказано је да неки комплекси рутенијума, као што је NAMI-A, узрокују дилатацију бубрежних тубула и оштећења гломерула тек када се примењују у дозама већим од 200 mg/kg. (281) Фармакокинетику NAMI-A је први пут профилисао *Cocchietto* у експерименту са СВА мишевима испитујући на њима токсичне ефекте и морбидитет после интравенске апликације комплекса. Експеримент је указује да NAMI-A испољава ефикасно антиметастаско дејство у свим фазама раста тумора и метастаза када се примењује интраперитонеално у дози од 35 mg/kg/дан у току 6 узастопних дана. Експерименталним мишевима је интравенски апликована иста, мања (15 mg/kg/дан) и већа доза комплекса (50 mg/kg/дан); праћено је токсиколошко дејство примењених доза на експерименталне животиње. Дозе NAMI-A са доказаним антиметастатским дејством и мање дозе комплекса нису изазвале токсичне ефекте код домаћина. Није било знакова хематотоксичности, напротив, бела крвна лоза је имала тенденцију транзитивног повећања, што није типично у случају примене других антитуморских агенаса. Такође, други параметри токсичности као што су вредности урее и креатинина током спровођења терапије се нису мењали. Међутим, примена већих доза NAMI-A је била праћена бројним токсичним ефектима који су се огледали у очигледној измени општег здравственог стања мишева. Уочене су евидентне промене у држању и изгледу, губитак телесне масе, погрбљеност, појачана саливација и већа смртност. Лабораторијска анализа крви експерименталних мишева третираних већим дозама испитиване супстанце је указала на пад вредности хематокрита, анемију, смањен волумен еритроцита и пораст броја тромбоцита. Високе дозе комплекса су довеле и до смањења броја ћелија беле крвне лозе, те пораста вредности урее и креатинина. Анализом органа жртвованих животиња уочена је статистички значајно мања величина и маса јетре, слезине и срца. Хистолошка анализа органа је указала на структурне промене лимфоидног ткива слезине, лимфних чворова и тимуса животиња третираних високим дозама комплекса. У слезинама ове групе животиња је примећена реактивна екстрамедуларна хематопоеза, као и структурне измене у бубрежном паренхиму праћене тубуларном базофилијом и хидронефрозом. Поједини мишеви су имали знаке мукозне лезије желуца и једњака у виду акутне инфламације. (282)

У нашем експерименту *in vitro* доказали смо да новосинтетисани комплекс рутенијума има изражен цититоксични и антипролиферативни ефекат на ћелије мишијег

карцинома колона СТ26. У оквиру испитивања антитуморске активности комплекса *in vivo* на моделу примарног хетеротопског карцинома колона BALB/c мишева, новосинтетисани комплекс рутенијума, примењен интравенски у дози од 10 mg/kg телесне масе експерименталне животиње, повећава преживљавање мишева са примарним тумором, смањује раст и метастазирање примарног тумора. Поред евидентног цитотоксичног и антитуморског дејства наш комплекса у ефективним дозама није довео до измене општег здравственог статуса у групи здравих лабораторијских мишева (контролна група третирана само комплексом рутенијума). Токсичност ефективне дозе комплекса (10 mg/kg телесне масе) процењена је и мерењем трансаминаза, урее и креатинина у серуму експерименталних мишева 21. дана од почетка примене комплекса. Анализиране су вредности у групама експерименталних мишева који су примали само комплекс рутенијума или само оксалиплатину, и у групама мишева који су наведене супстанце примали после трансплантације туморских ћелија. Резултати указују да испитивани комплекс рутенијума у дозама које имају доказан антитуморски ефекат не испољава хепато- и нефро- токсичност (Графикон 28). Међу испитиваним групама нема статистички значајне разлике у вредностима AST, ALT, урее и креатинина у серуму (статистичка значајност разлике међу наведеним групама је одређена Student-овим t тестом, нема статистички значајне разлике међу групама).

Поредећи податке из литературе који указују на потенцијалну токсичност комплекса рутенијума са резултатима нашег испитивања, можемо закључити да новосинтетисани комплекс рутенијума у значајно нижим дозама испољава жељене ефекте без пратеће хепато- рено- и хематотоксичности код експерименталних мишева.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Рутенијум(III) комплекс $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}})\text{Cl}_3]$ где $\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}} = 2,6\text{-бис}(5\text{-терц-бутил-1Н-пирозол-3-ил)пиридин}$) смањује раст и прогресију примарног карцинома колона изазваног субкутаном апликацијом СТ26 ћелија у сингеног BALB/с миша, засунавља СТ26 ћелије у G1 фази ћелијског циклуса, смањује њихову пролиферацију и изазива апоптотску смрт.

Закључак је изведен на основу следећих резултата:

1. Синтетисана је серија рутенијум(II) полипиридил комплекса опште формуле $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{chel})\text{Cl}]\text{Cl}$, где је Cl-tpy 4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин, chel је N-N бидентатни хелатни лиганд 1,2-диаминоетан (en, **1**), 1,2-диаминоциклохексан (dach, **2**) и 2,2'-бипиридин (bpy, **3**), N-O је пиколин (pic, **4**). Такође је синтетисан и окарактерисан рутенијум(III) комплекс $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}})\text{Cl}_3]$.
2. Интеракција рутенијум(II) терпиридин комплекса са аминокиселином L-хистидин је испитивана помоћу UV-Vis спектрофотометрије. Константа брзине реакције супституције зависи од природе инертног хелатног лиганда.
3. Рутенијум(II) терпиридин комплекси се везују снажно за ДНК и стабилизују ДНК дуплекс.
4. Рутенијум(II) терпиридин комплекси показују временски и дозно зависни цитотоксични ефекат на вијабилност СТ26, А549 и НСТ116 ћелије.
5. Новосинтетисан рутенијум(III) комплекс $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}})\text{Cl}_3]$ након 24 сата *in vitro* третирања СТ26 ћелија значајно повећава проценат ћелија у раној и касној апоптози и проценат СТ26 ћелија које експримирају проапоптотски молекул Ноха.
6. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс након 24 сата *in vitro* третирања СТ26 ћелија значајно повећава проценат ових ћелија у G1 фази ћелијског циклуса и смањује проценат Ki67+ СТ26 ћелија.
7. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује раст примарног хетеротопског карцинома колона СТ26, и повећава проценат апоптотичних туморских ћелија у ткиву примарног тумора.

8. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс смањује инциденцу метастазирања и проценат ткива захваћеног метастазама.
9. $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}})\text{Cl}_3]$ комплекс не испољава значајан токсични ефекат *in vivo*.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Torre LA, Bray F, Sigel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5):359–86.
3. Bray F, Soerjomataram I. Chapter 2. The Changing Global Burden of Cancer. In: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S, eds. *Disease Control Priorities*, 3rd edn. Volume 3: cancer. Washington, DC: World Bank; 2015.
4. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017; 66(4):683-91.
5. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
6. Willett W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature.* 1989;338(6214):389-94.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
8. Reddy B, Engle A, Katsifis S, et al.: Biochemical epidemiology of colon cancer: effect of types of dietary fiber on fecal mutagens, acid, and neutral sterols in healthy subjects. *Cancer Res.* 1989;49(16):4629-35.
9. Reddy BS, Tanaka T, Simi B: Effect of different levels of dietary trans fat or corn oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst.* 1985;75(4):791-8.
10. Chen CD, Yen MF, Wang WM, et al.: A case-cohort study for the disease natural history of adenoma-carcinoma and de novo carcinoma and surveillance of colon and rectum after polypectomy: implication for efficacy of colonoscopy. *Br J Cancer.* 2003;88(12):1866-73.

11. Young PE, Womeldorph CM, Johnson EK, et al. Early Detection of Colorectal Cancer Recurrence in Patients Undergoing Surgery with Curative Intent: Current Status and Challenges. *J Cancer*. 2014;5(4):262-71
12. Dahan L, Sadok A, Formento JL, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *Br J Pharmacol*. 2009;158(2):610-20.
13. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med*. 1990; 322(6):352-8.
14. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Fluorouracil plus Levamisole as Effective Adjuvant Therapy after Resection of Stage III Colon Carcinoma: A Final Report. *Ann Intern Med*. 1995;122(5):321-6.
15. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet*. 1995;345(8955):939-44.
16. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer: a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479-516.
17. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*. 2011;18(1):18–25.
18. Howells LM, Sale S, Sriramareddy SN, Irving GR, Jones DJ, Ottley CJ, Pearson DG, Mann CD, Manson MM, Berry DP, Gescher A, Steward WP, Brown K. Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2011;129(2):476-86.
19. Grothey A, Nikcevich DA, Sloan JA, et al. Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. *J Clin Oncol*. 2011; 29(4):421-7.
20. Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2007;340(3):117-26.
21. Antonarakis ES, Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(1):1-9.
22. Clarke MJ. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord Chem Rev*. 2003; 236: 209-233.

23. Brabec V, Novakova O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist Updat.* 2006;9(3): 111–22.
24. Kostova I. Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr Med Chem.* 2006;13(9):1085–107.
25. Sava G, Zorzet S, Turrin C, Vita F, Soranzo M, Zabucchi G, Cocchietto M, Bergamo A, DiGiovine S, Pezzoni G, Sartor L, Garbisa S. Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin Cancer Res.* 2003;9(5):1898-905.
26. Moreno V, Font-Bardia M, Calvet T, Lorenzo J, Aviles FX, Garcia MH, Morais TS, Valente A, Robalo MP. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *J Inorg Biochem.* 2011;105(2):241-9.
27. Martinez A, Suarez J, Shand T, Magliozzo RS, Sanchez-Delgado RA. Interactions of arene-Ru(II)-chloroquine complexes of known antimalarial and antitumor activity with human serum albumin (HSA) and transferrin. *J Inorg Biochem.* 2011;105(1): 39-45.
28. Kapitza S, Jakupec MA, Uhl M, Keppler BK, Marian B. The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. *Cancer Lett.* 2005;226(2):115-21.
29. Du KJ, Wang JQ, Kou JF, Li GY, Wang LL, Chao H, Ji LN. Synthesis, DNA-binding and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Eur J Med Chem.* 2011;46(4):1056-65.
30. Li L, Wong YS, Chen T, Fan C, Zheng W. Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. *Dalton Trans.* 2012;41(4):1138-41
31. Lima AP, Pereira FC, Almeida MA, Mello FM, Pires WC, Pinto TM, Delella FK, Felisbino SL, Moreno V, Batista AA, de Paula Silveira-Lacerda E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *PLoS ONE.* 2014;9(10):e105865.
32. Anchuri SS, Thota S, Yerra R, Devarakonda KP, Dhulipala S. Novel mononuclear ruthenium(II) compounds in cancer therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(7): 3293-8.

33. Irving MH, Catchpole B. ABC of colorectal diseases: Anatomy and physiology of the colon, rectum, and anus. *BMJ* 1992;304(6834):1106-8.
34. Шљивић Б. Систематска и топографска анатомија – абдомен и карлица. 3. издање, Научна књига, Београд, 1979.
35. Buczacki SJ, Davies RJ. Colon resection: is standard technique adequate? *Surg Oncol Clin N Am.* 2014;23(1):25-34.
36. Sondenaa K, Quirke P, Hohenberger W, Sugihara K, Kobayashi H, Kessler H, Brown G, Tudyka V, D'Hoore A, Kennedy RH, West NP, Kim SH, Heald R, Storli KE, Nesbakken A, Moran B. The rationale behind complete mesocolic excision (CME) and a central vascular ligation for colon cancer in open and laparoscopic surgery: proceedings of a consensus conference. *Int J Colorectal Dis.* 2014;29(4):419-28.
37. de Santa Barbara P, van den Brink GR, Roberts DJ. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(7):1322-32.
38. Vishal VR, Preeti D, Vidyadhar H, Sunil P. An overview on colonic drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2011;6(2): 197-204.
39. Wang H, Iwasaki M, Haiman CA, Kono S, Wilkens LR, Keku TO, Berndt SI, Tsugane S, Le Marchand L. Interaction between Red Meat Intake and NAT2 Genotype in Increasing the Risk of Colorectal Cancer in Japanese and African Americans. *Hold GL, ed. PLoS ONE.* 2015;10(12):e0144955.
40. Berger NA: Obesity and cancer pathogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 2014;1311:57-76.
41. Doerner SK, Reis ES, Leung ES, Ko JS, Heaney JD, Berger NA, Lambris JD, Nadeau JH. High-Fat Diet-Induced Complement Activation Mediates Intestinal Inflammation and Neoplasia, Independent of Obesity. *Mol Cancer Res.* 2016;14(10):953-65.
42. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Lipworth L, La Vecchia C. Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010. *Curr Pharm Des.* 2011;17(8): 805-12.
43. D'Archivio M, Scazzocchio B, Giammarioli S, et al. ω 3-PUFAs Exert Anti-Inflammatory Activity in Visceral Adipocytes from Colorectal Cancer Patients. *Schunck W-H, ed. PLoS ONE* 2013;8(10): e77432.

44. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013;19(5): 557-66.
45. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. AICR, Washington, DC: 2007.
46. Williams CD, Satia JA, Adair LS, *et al.* Associations of Red Meat, Fat, and Protein Intake With Distal Colorectal Cancer Risk. *Nutr Cancer.* 2010;62(6):701-9.
47. Chan DS, Lau R, Aune D, *et al.* Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. Tomé D, ed. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e20456.
48. Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Primary and Secondary Prevention of Colorectal Cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2014;7:33-46.
49. Bonovas S, Fiorino G, Lytras T, Malesci A, Danese S. Calcium supplementation for the prevention of colorectal adenomas: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol.* 2016;22(18):4594-603.
50. Aune D, Chan DS, Lau R *et al.* Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ.* 2011;343: d6617.
51. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA, *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA.* 2005;294(22):2849-57.
52. Williams PG. The benefits of breakfast cereal consumption: a systematic review of the evidence base. *Adv Nutr.* 2014;5(5): 636-73.
53. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *CCC,* 2013;24(6):1207-22.
54. Ma Y, Yang Y, Wang F, *et al.* Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. Gorlova OY, ed. *PLoS ONE.* 2013; 8(1): e53916.
55. Wolin KY, Tuchman H. Physical Activity and Gastrointestinal Cancer Prevention. *Recent Results Cancer Res.* 2010;186:73-100.
56. Ward BW, Schiller JS. Prevalence of multiple chronic conditions among US adults: estimates from the National Health Interview Survey, 2010. *Prev Chronic Dis.* 2013;10:E65

57. Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar M-L, Mato JM, Lu SC. Alcohol, DNA Methylation, and Cancer. *Alcohol Res.* 2013;35(1):25-35.
58. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011; 22(9):1958-72.
59. Meyer F, White E: Alcohol and nutrients in relation to colon cancer in middle-aged adults. *Am J Epidemiol.* 1993;138(4):225-36.
60. Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, et al. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes Control.* 1990;1(1):59-68.
61. Faivre J, Boutron MC, Senesse P, Couillaud C, Belighiti C, Meny B. Environmental and familial risk factors in relation to the colorectal adenoma--carcinoma sequence: results of a case-control study in Burgundy (France). *Eur J Cancer Prev.* 1997;6(2):127-31.
62. Neugut AI, Jacobson JS, DeVivo I. Epidemiology of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993;2(2):159-76.
63. Knekt P, Hakama M, Järvinen R, et al. Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998;78(1):136-9.
64. Baron JA, Sandler RS, Haile RW, et al. Folate intake, alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(1):57-62.
65. Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A et al. A prospective study of duration of smoking cessation and colorectal cancer risk by epigenetics-related tumor classification. *Am J Epidemiol.* 2013;178(1):84-100.
66. Terry P, Ekblom A, Lichtenstein P, et al. Long-term tobacco smoking and colorectal cancer in a prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2001;91(4): 585-7.
67. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA,* 2008;300(23):2765-78.
68. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet.* 2010;376(9754): 1741-50.

69. Chubak J, Whitlock EP, Williams SB, et al. Aspirin for the Prevention of Cancer Incidence and Mortality: Systematic Evidence Reviews for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2016;164(12):814-25.
70. Cook NR, Lee IM, Zhang SM, et al. Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: long-term observational follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2013;159(2):77-85.
71. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med.* 2012;367(17):1596-606.
72. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):883-90.
73. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson J-Å. Estrogen Receptor Beta as Target for Colorectal Cancer Prevention. *Cancer Lett.* 2016;372(1):48-56.
74. *Cancer Facts & Figures 2017.* Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2017.
75. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *Int J Cancer.* 2011;128: 1668-75.
76. RE Curtis, DM Freedman, E Ron, et al. New malignancies among cancer survivors: SEER cancer registries 1973–2000 (NIH publication no 05-3302), National Cancer Institute, Bethesda; 2006.
77. Ren J, Kirkness CS, Kim M, Asche CV, Puli S. Long-term risk of colorectal cancer by gender after positive colonoscopy: population-based cohort study. *Curr Med Res Opin.* 2016;32(8):1367-74.
78. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(4):789-99.
79. Castano-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(7): 645-59.
80. Risio M. The Natural History of pT1 Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2012;2:22.
81. Patel SG, Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14(5):428-38.

82. Peters U, Hutter CM, Hsu L, et al. Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk. *Hum Genet.* 2012;13182): 217-34.
83. Katsoula A, Paschos P, Haidich AB, et al. Diagnostic Accuracy of Fecal Immunochemical Test in Patients at Increased Risk for Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 2017;177(8):1110-8.
84. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TM, et al. Increased risk of colorectal neoplasia among family members of patients with colorectal cancer: a population-based study in Utah. *Gastroenterology.* 2014;147(4): 814-21
85. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, et al. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(2):223-62.
86. Win AK, Lindor NM, Young JP, et al. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(18): 1363-72.
87. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA.* 2011;305(22): 2304-10.
88. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2014;10988):1159-79.
89. Ricciardiello L, Ahnen DJ, Lynch PM. Chemoprevention of hereditary colon cancers: time for new strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(6): 352-61.
90. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology.* 2014;27(1):9-14.
91. Panjwani S, Bagewadi A, Keluskar V, Arora S. Gardner's Syndrome. *J Clin Imaging Sci.* 2011;1:65.
92. Singer G, Hoellwarth ME. Colorectal carcinomas in children: an institutional experience. *Pediatr Surg Int.* 2012;28(6):591-5.
93. Sereno M, Merino M, Lopez- Gomez M, et al. MYH polyposis syndrome: clinical findings, genetics issues and management. *Clin Transl Oncol.* 2014;16(8):675-9.
94. Kuiper RP, Hoogerbrugge N. NTHL1 defines novel cancer syndrome. *Oncotarget.* 2015;6(33):34069-70.

95. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2000;21(6):167-223.
96. Grady WM, Markowitz SD. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):762-72.
97. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012;5(1):19-27
98. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):120-35.
99. Hodgson SV, Foulkes WD, Eng C, Maher ER. Inherited Cancer-Predisposing Syndromes. In: *A Practical Guide to Human Cancer Genetics.* Springer, London. 2014;219-359
100. Mohammed MK, Shao C, Wang J, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis.* 2016;3(1):11-40.
101. Liu X, Jakubowski M, Hunt JL: KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(2):245-52.
102. Shankar S, Pitchiaya S, Malik R, et al. KRAS engages AGO2 to enhance cellular transformation. *Cell Rep.* 2016;14(6):1448-61.
103. Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, et al. Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell.* 2013;23(5):634–46.
104. Yan WF, Wu G, Sun PC, Qiu D. P53 mutations occur more commonly than KRAS mutations in colorectal adenoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):1370–5.
105. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87.
106. Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, et al. Mutational strand asymmetries in cancer genomes reveal mechanisms of DNA damage and repair. *Cell.* 2016;164(3):538-49.
107. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN and FOCUS studies. *Clin Cancer Res.* 2014;20(20):5322-30.

108. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, Frankel WL, Pearlman R, De La Chapelle A, et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1308–16.
109. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, Van Zelst-Stams WA, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJ, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology*. 2014;146(3):643-6.
110. Moreira L, Muñoz J, Cuatrecasas M, Quintanilla I, Leoz ML, Carballal S, et al. Prevalence of somatic mutl homolog 1 promoter hypermethylation in Lynch syndrome colorectal cancer. *Cancer*. 2015;121(9):1395-404.
111. Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(4):943-56.
112. Silva A-L, Dawson SN, Arends MJ, Guttula K, Hall N, Cameron EA, et al. Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer*. 2014;14:891.
113. Simons CC, Hughes LA, Smits KM, Khalid-De Bakker CA, De Bruïne AP, Carvalho B, et al. A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis. *Ann Oncol*. 2013;24(8): 2048–56.
114. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology*. 2015;148(1):77-87.
115. Shitara K, Yonesaka K, Denda T, et al. Randomized study of FOLFIRI plus either panitumumab or bevacizumab for wild-type KRAS colorectal cancer-WJOG 6210G. *Cancer Sci*. 2016;107(12):1843-50.
116. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2015;51(5):587-94.

117. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219–26.
118. Del Giudice ME, Vella ET, Hey A, Simunovic M, Harris W, Levitt C. Systematic review of clinical features of suspected colorectal cancer in primary care. *Can Fam Physician*. 2014;60(8):e405-15.
119. Williams TGS, Cubiella J, Griffin SJ, Walter FM, Usher-Smith JA. Risk prediction models for colorectal cancer in people with symptoms: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2016;16(1):63.
120. Thompson MR, O'Leary DP, Flashman K, Asimwe A, Ellis BG, Senapati A. Clinical assessment to determine the risk of bowel cancer using Symptoms, Age, Mass and Iron deficiency anaemia (SAMI). *Br J Surg*. 2017;104(10):1393-404.
121. Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract*. 2011;61(586):e231-43.
122. Rabeneck L, Rumble RB, Thompson F, et al. Fecal immunochemical tests compared with guaiac fecal occult blood tests for population-based colorectal cancer screening. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(3):131-47.
123. Vega P, Valentín F, Cubiella J. Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities. *World J Gastrointest Oncol*. 2015;7(12):422-33.
124. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. 2016;11:967-76.
125. Garborg K, Holme Ø, Løberg M, Kalager M, Adami HO, Bretthauer M. Current status of screening for colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(8):1963-72.
126. Siminoff L, Thomson M, Dumenci L. Factors associated with delayed patient appraisal of colorectal cancer symptoms. *Psychooncology*. 2014;23(9):981-8.
127. Esteva M, Leiva A, Ramos M, Pita-Fernández S, González-Luján L, Casamitjana M, Sánchez MA, Pértega-Díaz S, Ruiz A, Gonzalez-Santamaría P, et al. Factors related with symptom duration until diagnosis and treatment of symptomatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:87.

128. Eskeland SL, Dalén E, Sponheim J, Lind E, Brunborg C, de Lange T. European panel on the appropriateness of gastrointestinal endoscopy II guidelines help in selecting and prioritizing patients referred to colonoscopy--a quality control study. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(4):492–500.
129. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Winawer and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1570-95.
130. Anderson JC, Butterly LF. Colonoscopy: Quality Indicators. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015;6(2):e77
131. Ahn SB, Han DS, Bae JH, Byun TJ, Kim JP, Eun CS. The Miss Rate for Colorectal Adenoma Determined by Quality-Adjusted, Back-to-Back Colonoscopies. *Gut Liver*. 2012;6(1):64-70.
132. Laghi A. Computed tomography colonography in 2014: An update on technique and indications. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):16858-67
133. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. *Radiology*. 2011;259(2):393-405.
134. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, et al. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014;135(2):371-8.
135. Halligan S, Dadswell E, Wooldrage K, Wardle J, von Wagner C, Lilford R, Yao GL, Zhu s, Atkin W. Computed tomographic colonography compared with colonoscopy or barium enema for diagnosis of colorectal cancer in older symptomatic patients: two multicentre randomised trials with economic evaluation (the SIGGAR trials). *Health Technol Assess*. 2015;19(54):1-134.
136. Nerad E, Lahaye MJ, Maas M, Nelemans P, Bakers FC, Beets GL, et al. Diagnostic Accuracy of CT for Local Staging of Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *AJR Am J Roentgenol*. 2016;207(5):984-95.
137. Guniganti P, Lewis S, Rosen A, Connolly S, Raptis C, Mellnick V. Imaging of acute anorectal conditions with CT and MRI. *Abdom Radiol (NY)*.2017;42(2):403-22.

138. Jaffe T, Thompson WM. Large-Bowel Obstruction in the Adult: Classic Radiographic and CT Findings, Etiology, and Mimics. *Radiology*. 2015;275(3):651-63.
139. Dighe S, Purkayastha S, Swift I, Tekkis PP, Darzi A, A'Hern R. Diagnostic precision of CT in local staging of colon cancers: a meta-analysis. *Clin Radiol*. 2010. 65(9):708-19.
140. Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M, Tyndall A, Hohmann J. Colorectal cancer: Current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation. *World J Gastroenterol*. 2013;19(46):8502-14.
141. Bipat S, Niekel MC, Comans EF, Nio CY, Bemelman WA, Verhoef C, Stoker J. Imaging modalities for the staging of patients with colorectal cancer. *Neth J Med*. 2012;70(1):26–34.
142. Parnaby CN, Bailey W, Balasingam A, Beckert L, Eglinton T, Fife J, Frizelle FA, Jeffery M, Watson AJ. Pulmonary staging in colorectal cancer: a review. *Colorectal Dis*. 2012;14(6):660-70.
143. Kim HY, Lee SJ, Lee G, Song L, Kim SA, Kim JY, Chang DK, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC, et al. Should Preoperative Chest CT Be Recommended to All Colon Cancer Patients? *Ann Surg*. 2014;259(2):328-8.
144. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 2016;22(5):1745-55.
145. Dickinson BT, Kisiel J, Ahlquist DA, Grady WM. Molecular markers for colorectal cancer screening. *Gut*. 2015;64(9):1485-94.
146. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(1):118-26.
147. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*. 1965;121:439-62.
148. Duffy MJ, Lamerz R, Haglund C, Nicolini A, Kalousová M, Holubec L, Sturgeon C. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *Int J Cancer*. 2014;134(11):2513-22.

149. Lumachi F, Marino F, Orlando R, Chiara GB, Basso SM. Simultaneous multianalyte immunoassay measurement of five serum tumor markers in the detection of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2012;32(3):985-8.
150. Zhong W, Yu Z, Zhan J, Yu T, Lin Y, Xia ZS, Yuan YH, Chen QK. Association of serum levels of CEA, CA199, CA125, CYFRA21-1 and CA72-4 and disease characteristics in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(1):83–95.
151. Lanza G, Messerini L, Gafà R. and Risio M. Colorectal tumors: The histology report. *Dig Liver Dis.* 2011;43(4):344-55
152. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, Vieth M, Rehak P. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis? *Histopathology.* 2012;60(7):1060-72.
153. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153-73.
154. Thirunavukarasu P, Sathaiyah M, Singla S, et al. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. *Int J Oncol.* 2010;37(4):901-7.
155. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives. *Histol Histopathol.* 2015;30(9):1059-67.
156. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura SI, Quirke P, Riboli E, Sobin LH. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman T, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (ed). *WHO classification of tumors of the digestive system.* Lyon. IARC. 2010; 134-46.
157. Rosty C, Williamson EJ, Clendenning M, Walters RJ, Win AK, Jenkins MA, Hopper JL, Winship IM, Southey MC, Giles GG, English DR, Buchanan DD. Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status? *Hum Pathol.* 2014; 45(10):2077-84.
158. Wittekind C, Oberschmid B. Pathological staging and response evaluation of rectal carcinoma. *Chirurg.* 2012;83(5):423-9.
159. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol.* 1932; 35:323-32.
160. Akkoca AN, Yanık S, Özdemir ZT, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(9):2828-35.

161. Astler VB, Collier FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954;139(6):846-52.
162. Washington MK, Berlin J, Branton P, et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(10):1539-51.
163. Saha S, Shaik M, Johnston G, et al. Tumor size predicts long-term survival in colon cancer: an analysis of the National Cancer Data Base. *Am J Surg.* 2015;209(3):570-4.
164. Edge SB, Compton CC. The American joint Committete on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-4.
165. Ong ML, Schofield JB. Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World J Gastrointes Surg.* 2016;8(3):179-92.
166. Hugén N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol.* 2014; 25(3):651-7
167. American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019.* Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2017.
168. West NP, Hohenberger W, Weber K, et al. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *J Clin Oncol.* 2010;28(2):272-8.
169. Tan KY, Kawamura YJ, Mizokami K, et al. Distribution of the first metastatic lymph node in colon cancer and its clinical significance. *Colorectal Dis.* 2010;12(1):44-7.
170. Xynos E, Gouvas N, Triantopoulou C, et al. Clinical practice guidelines for the surgical management of colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol.* 2016;29(1):3-17.
171. Sajid MS, Siddiqui MR, Baig MK. Single layer versus double layer suture anastomosis of the gastrointestinal tract. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;1:CD005477.

172. Carrara A, Mangiola D, Pertile R, et al. Analysis of risk factors for lymph nodal involvement in early stages of rectal cancer:when can local excision be considered an appropriate treatment? Systematic review and meta-analysis of the literature. *Int J Surg Oncol* 2012. 2012:438450.
173. Xynos E, Tekkis P, Gouvas N, et al. Clinical practice guidelines for the surgical treatment of rectal cancer: a consensus statement of the Hellenic Society of Medical Oncologists (HeSMO). *Ann Gastroenterol*. 2016;29(2):103-26.
174. Paun BC, Cassie S, MacLean AR, Dixon E, Buie WD. Postoperative Complications Following Surgery for Rectal Cancer. *Ann Surg*. 2010;251(5): 807-18
175. Enriquez-Navascues JM, Borda N, Lizerazu A, et al. Patterns of local recurrence in rectal cancer after a multidisciplinary approach. *World J Gastroenterol*. 2011;17(13):1674-84.
176. Kido A, Koyama F, Akahane M, et al. Extent and contraindications for sacral amputation in patients with recurrent rectal cancer:a systematic literature review. *J Orthop Sci*. 2011;16(3):286-90.
177. Bhangu A, Ali SM, Cunningham D, et al. Comparison of long-term survival outcome of operative vs nonoperative management of recurrent rectal cancer. *Colorectal Dis*. 2013;15(2):156-63.
178. Bhangu A, Ali SM, Darzi A, et al. Meta-analysis of survival based on resection margin status following surgery for recurrent rectal cancer. *Colorectal Dis*. 2012;14(12):1457-66.
179. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27 (8):1386-422
180. Weiser MR, Jarnagin WR, Saltz LB. Colorectal cancer patients with oligometastatic liver disease: what is the optimal approach? *Oncology (Williston Park)*. 2013;27(11):1074-8.
181. Adam R, De Gramont A, Figueras J et al. The oncosurgery approach to managing liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Oncologist*. 2012;17(10):1225-39.

182. Jones RP, Stattner S, Sutton P et al. Controversies in the oncosurgical management of liver limited stage IV colorectal cancer. *Surg Oncol.* 2014; 23(2):53-60
183. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol.* 2012;4:283-301.
184. Elias D, Mariani A, Cloutier AS et al. Modified selection criteria for complete cytoreductive surgery plus HIPEC based on peritoneal cancer index and small bowel involvement for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(11):1467-73
185. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116(2):205–19.
186. Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007;14(4): 641-50
187. Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol.* 2012;34(3):192-9.
188. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305(5684):626–9.
189. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91(4):479-89.
190. Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene.* 2008;27(1):S84-92
191. Sinicrope FA, Penington RC, Tang XM. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8284-92
192. Kountourakis P, Souglakos J, Gouvas N, et al. Adjuvant chemotherapy for colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. *Ann Gastroenterol.* 2016;29(1):18-23.

193. Schmoll HJ, Twelves C, Sun W, et al. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III colon cancer and the effect of oxaliplatin on post-relapse survival: a pooled analysis of individual patient data from four randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1481-92.
194. Sanoff HK, Carpenter WR, Martin CF, et al. Comparative effectiveness of oxaliplatin vs non-oxaliplatin-containing adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(3):211-27.
195. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil and Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1465-71.
196. Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ et al. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2011;305(22):2335-42
197. Andre T, Iveson T, Labianca R, et al. The IDEA (International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy) Collaboration: prospective combined analysis of phase III trials investigating duration of adjuvant therapy with the FOLFOX (FOLFOX4 or modified FOLFOX6) or XELOX (3 versus 6 months) regimen for patients with stage III colon cancer: trial design and current status. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2013;9:261-9.
198. O'Connor ES, Greenblatt DY, Loconte NK, et al. Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer With Poor Prognostic Features. *J Clin Oncol.* 2011;29(25):3381-8.
199. Gaujoux S, Goere D, Dumont F, et al. Complete radiological response of colorectal liver metastases after chemotherapy: what can we expect? *Dig Surg.* 2011;28(2):114-20.
200. McCahill LE, Yothers GA. A phase II trial of 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) chemotherapy plus bevacizumab (bev) for patients (pts) with unresectable stage IV colon cancer and a synchronous asymptomatic primary tumor: Results of NSABP C-10. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):3527
201. Mayer RJ. Oxaliplatin as part of adjuvant therapy for colon cancer: more complicated than once thought. *J Clin Oncol.* 2012;30(27):3325-7.

202. Levina A, Mitra A, Lay PA. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics*. 2009;1(6):458-70.
203. Taube H. Ruthenium(II) Ammines- A Study in Reactivity. *Surv Prog Chem*. 1973;6:1-46.
204. Huheey JE. Principles of Structure and Reactivity, 2nd edn., Ed. Harper and Row, New York, 1978;276.
205. Krentzein H, Taube H. Binuclear mixed valence rutheniumammine complexes with tert-butylmalononitrile as bridging ligand. *J Am Chem Soc*. 1976;98(20):6379-80.
206. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem Rev*. 1999;99(9):2511-34.
207. Kelman AD, Clarke MJ, Edmonds SD, Peresie HJ. Biological activity of ruthenium purine complexes. *J Clin Hematol Oncol*. 1977;7:274-88
208. Schluga P, Hartinger CG, Egger A, Reisner E, Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Trans*. 2006;14(14):1796-802.
209. Allardyce CS, Dyson PJ. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platinum Met Rev*. 2001; 45(2):62-9.
210. Sava G, Bergamo A. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). *Int J Oncol*. 2000;17(2):353-65.
211. Sava G, Zorzet S, Giraldi T, Mestroni G, Zassinovich G. Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium(II) in comparison with cis-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1984; 20(6):841-7.
212. Clarke MJ. Erratum to "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord Chem Rev*. 2002; 232:69-93.
213. Mestroni G, Alessio E, Sava G, Pacor S, Coluccia M, Boccarelli A. Water-Soluble Ruthenium(III)-Dimethyl Sulfoxide Complexes: Chemical Behaviour and Pharmaceutical Properties. *Met Based Drugs*. 1994;1(1):41-63.
214. Alessio E. Synthesis and Reactivity of Ru-, Os-, Rh-, and Ir Halide-Sulfoxide Complexes. *Chem Rev*. 2004;104(9):4203-42.

215. Bratsos I, Bergamo A, Sava G, Gianferrera T, Zangrando E, Alessio E. Influence of the anionic ligands on the anticancer activity of Ru(II)-dmsO complexes: Kinetics of aquation and in vitro cytotoxicity of new dicarboxylate compounds in comparison with their chloride precursors. *J Inorg Biochem.* 2008;102(4):606-17.
216. Bratsos I, Jedner S, Gianferrera T, Alessio E. Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. *Chimia.* 2007;61(11):692-97.
217. Reisner E, Arion VB, Keppler BK, Pombeiro AJL. Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. *Inorg Chim Acta.* 2008; 361:1569-83.
218. Wheate NJ, Brodie CR, Collins JG, Kemp S, Aldrich-Wright JR. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini Rev Med Chem.* 2007;7(6):627-48.
219. Chatterjee D, Mitra A, De GS. Ruthenium Polyaminocarboxylate Complexes. *Platinum Met Rev.* 2006;50:2-12.
220. Ang WH, Dyson PJ. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. *Eur J Inorg Chem.* 2006;20:4003-18.
221. Melchart M, Sadler PJ. Ruthenium arene anticancer complexes. In: Jaouen G. (Ed.), *Bioorganometallics.* Wiley-VCH: Weinheim, Germany. 2006;39-64.
222. Bergamo A, Masi A, Dyson PJ, Sava G. Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound. *Int J Oncol.* 2008;33(6):1281-9
223. Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler B. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev.* 2006;106(6):2224-48.
224. Kalinowski D, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(4):547-83.
225. Chatterjee D, Mitra A, Levina A, Lay PA. A potential role for protein tyrosine phosphatase inhibition by a Ru(III)-edta complex (edta = ethylenediaminetetraacetate) in its biological activity. *Chem Commun.* 2008;7(25):2864-6.
226. Meggers E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. *Curr Opin Chem Biol.* 2007; 11(3):287-92.

227. a) Sava G, Alessio E, Bergamo A, Mestroni G. Sulfoxide ruthenium complexes: non toxic tools for the selective treatment of solid tumour metastases. In: Clarke MJ, Sadler PJ. (Eds.), Topics in Biological Inorganic Chemistry. Metallopharmaceuticals. Springer, Berlin. 1999;1:143-69. b) Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, Sava G. Ruthenium antimetastatic agents. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(15):1525-35.
228. Brindell M, Stawoska I, Supel J, Skoczowski A, Stochel G, Eldik R. The reduction of (ImH)[trans-RuIII Cl₄(dmsO)(Im)] under physiological conditions: preferential reaction of the reduced complex with human serum albumin. *J Biol Inorg Chem.* 2008;13(6):909-18.
229. Sava G, Capozzi I, Clerici K, Gagliardi G, Alessio E, Mestroni G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin Exp Metastasis.* 1998;16(4):371-9.
230. Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans.* 2007;13:1267-72.
231. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK. From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem.* 2006;100(5-6):891-904.
232. Chen H, Parkinson JA, Parsons S, Coxall RA, Gould RO, Sadler PJ. Organometallic ruthenium(II) diamine anticancer complexes: arene-nucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts. *J Am Chem Soc.* 2002;124(12):3064-82.
233. Yan YK, Melchart M, Habtemariam A, Sadler PJ. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun. (Camb).* 2005;(38):4764-76.
234. Aird RE, Cummings J, Ritchie AA, Muir M, Morris Re, Chen H, Sadler PJ, Jodrell DI. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2002;86(10):1652-7.

235. Peacock AF, Sadler PJ. Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. *Chem Asian J.* 2008; 3(11):1890-9.
236. Morris RE, Aird RE, Murdoch Pdel S, Chen H, Cummings J, Hughes ND, Parsons S, Parkin A, Boyd G, Jodrell DI, Sadler PJ. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J Med Chem.*2001; 44(22):3616-21.
237. Chen H, Parkinson JA, Morris RE, Sadler PJ. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms.*J Am Chem Soc.* 2003; 125(1):173-86.
238. Wang F, Chen H, Parsons S, Oswald ID, Davidson JE, Sadler PJ. Kinetics of aquation and anation of ruthenium(II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts. *Chemistry.* 2003;9(23):5810-20.
239. Liu HK, Berners-Price SJ, Wang F, Parkinson JA, Xu J, Bella J, Sadler PJ. Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex. *Angew Chem Int Ed Engl.*2006;45(48):8153-6.
240. Novakova O, Chen H, Vrana O, Rodger A, Sadler PJ, Brabec V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media.*Biochem.*2003;42(39):11544-54.
241. Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(7):3611-6.
242. Wang F, Chen H, Parkinson JA, Murdoch Pdel S, Sadler PJ. Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine. *Inorg Chem.* 2002;41(17):4509-23.
243. Messori L, Orioli P, Vullo D, Alessio E, Iengo E. A spectroscopic study of the reaction of NAMI, a novel ruthenium(III)anti-neoplastic complex, with bovine serum albumin. *Eur J Biochem.* 2000; 267(4):1206-13.
244. Hu W, Luo Q, Ma X, Wu K, Liu J, Chen Y, Xiong S, Wang J, Sadler PJ, Wang F. Arene control over thiolate to sulfinate oxidation in albumin by organometallic ruthenium anticancer complexes. *Chemistry.*2009;15(27):6586-94.
245. Novakova O, Kasparikova J, Vrana O, van Vliet PM, Reedijk J, Brabec V. Correlation between cytotoxicity and DNA binding of polypyridyl ruthenium complexes. *Biochemistry.* 1995; 34(38):12369-78.

246. van Vliet PM, Toekim MS, Haasnoot JG, Reedijk J, Novakova O, Vrana O, Brabec V. *mer*-[Ru(terpy)Cl₃] (terpy = 2,2':6',2''-terpyridine) shows biological activity, forms interstrand cross-links in DNA and binds two guanine derivatives in a *trans* configuration. *Inorg. Chim. Acta*, 1995;231(1-2):57-64
247. van Vliet PM, Haasnoot JG, Reedijk J. *Inorg. Chem.* 1994; 33:1934-39
248. Zobi F, Hohi M, Zimmermann I, Alberto R. *Inorg Chem.*2004; 43:2771-72.
249. Karidi K, Garoufis A, Hadjiliadis N, Lutz M, Spek AL, Reedijk J. Synthesis, characterization, and DNA-binding studies of nitro(oligopyridine)ruthenium(II) complexes. *Inorg Chem.* 2006;45(25):10282-92.
250. Velders AH, Kooijman H, Spek AL, Haasnoot JG, de Vos D, Reedijk J. Strong differences in the *in vitro* cytotoxicity of three isomeric dichlorobis(2-phenylazopyridine)ruthenium(II) complexes. *Inorg Chem.* 2000;39(14):2966-7.
251. Wasylenko DJ, Ganesamoorthy C, Kolvisto BD, Henderson MA, Berllinguetta CP. Insight into water oxidation by mononuclear polypyridyl Ru catalysts. *Inorg Chem.*2010;49(5):2202-9.
252. Rilak A, Bratsos I, Zangrando E, Kljun J, Turel I, Bugarčić ŽD, Alessio E. New Water-Soluble Ruthenium(II) Terpyridine Complexes for Anticancer Activity: Synthesis, Characterization, Activation Kinetics, and Interaction with Guanine Derivatives. *Inorg. Chem.*2014;53(12):6113-26.
253. Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(II) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016;45(11):4633-46.
254. Altomare A, Burla MC, Camalli M, Cascarano GL, Giacovazzo C, Guagliardi A, Moliterni AGG, Polidori G, Spagna R. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. *J Appl Crystallogr.*1999;32(1):115-9.
255. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A.* 2008;64(Pt1):112-22.
256. M. L. Tobe and J. Burgess, in *Inorganic Reaction Mechanism*, Longman, England, 1999, ch. 2, 4.

257. Caruso F, Monti E, Matthews J, Rossi M, Gariboldi MB, Pettinari C, Pettinari R, Marchetti F. Synthesis, characterization, and antitumor activity of water-soluble (arene)ruthenium(II) derivatives of 1,3-dimethyl-4-acylpyrazolon-5-ato ligands. First example of Ru(arene)(ligand) antitumor species involving simultaneous Ru-N7(guanine) bonding and ligand intercalation to DNA. *Inorg Chem.* 2014;53(7):3668-77.
258. a) A. D. Becke, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 5648-5652; b) C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev.*, 1988, 37, 785-789; c) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, 98, 11623-11627; d) T. H. Dunning and P. J. Hay, *Mod. Theor. Chem.*, 1976, 3, 1-28; e) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, 82, 270-283; f) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, 82, 284-298; g) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, 82, 299-310; h) *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations* (Ed.: S. Huzinaga), Elsevier, Amsterdam, 1984.
259. The performance of the computational level employed in this study is well documented, see for example: a) R. Puchta, R. Meier, N. J. R. van Eikema Hommes and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg.Chem.*, 2006, 56, 4063 – 4067; b) A. Scheurer, H. Maid, F. Hampel, R. W. Saalfrank, L. Toupet, P. Mosset, R. Puchta and N. J. R. Van Eikema Hommes, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 63, 2566-2574; c) P. Illner, A. Zahl, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *J. Organomet. Chem.*, 2005, 690, 3567-3576; d) Ch. F. Weber, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *Angew. Chem.*, 2005, 117, 6187-6192; e) Ch. F. Weber, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *Angew. Chem Int. Ed.*, 2005, 44, 6033-6038.
260. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, J. T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick,

- A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, Gaussian 03, (Revision B.03), Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004.
261. Chatterjee D, Sengupta A, Mitra A. Synthesis, characterization and reactivity of a novel ruthenium(II) complex containing polypyridyl ligand. *Polyhedron*. 2007;26(1):178-83.
262. Papaefstathiou GS, Sofetis A, Raptopoulou CP, Terzis A, Spyroulias GA, Zafiropoulos TF. 2,2'-Bipyridine,1,10-phenanthroline and 2,2':6',2''-terpyridine in gallium(III) chemistry: complexes containing the $\{Ga^{III}_2(\mu-OH)_2\}^{4+}$ core. *J Mol Struct*. 2007;837(1-3): 5-14.
263. Dyson PJ, Sava G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans*.2006;(16):1929-33.
264. Spiewak K, Brindell M. Impact of low- and high-molecular-mass components of human serum on NAMI-A binding to transferrin. *J Biol Inorg Chem*.2015;20(4): 695-703.
265. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969;222(5191): 385-6.
266. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC and Alberts SR. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(1):23-30.
267. Zeng L, Gupta P, Chen Y, Wang E, Ji L, Chao H, Chen ZS. The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. *Chem Soc Rev*. 2017;46(19):5771-804.
268. Łomzik M, Mazuryk O, Rutkowska-Zbik D, Stochel G, Gros PC, Brindell M. New ruthenium compounds bearing semicarbazone 2-formylpyridine moiety : playing with auxiliary ligands for tuning the mechanism of biological activity. *J Inorg Biochem*.2017;175:80–91.

269. Mazuryk O, Lomzik M, Martineau D, Beley M, Brindell M, et al. Anticancer activity of ruthenium(II) polypyridine complexes bearing pyrrolidine substituents. *Inorgani Chim Acta*, Elsevier, 2016; 443: 86-90.
270. Clarke MJ. Oncological implications in the chemistry of ruthenium. In: *Metals Ions in Biological Systems*. 1980;11:231-83.
271. Bergamo A, Gagliardi R, Scarcia V, Furlani A, Alessio E, Mestroni G, Sava G. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther*.1999;289(1):559-64
272. Saltz LB, Clarke S, Di'az-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008;26(12):2013-9
273. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2938-47.
274. Vietor NO, George BJ. Oxaliplatin-induced hepatocellular injury and ototoxicity: a review of the literature and report of unusual side effects of a commonly used chemotherapeutic agent. *J Oncol Pharm Pract*. 2012;18(3):355-9.
275. Alves de Souza CE, Alves de Souza HM, Stipp MC, Corso CR, Galindo CM, Cardoso CR, Dittrich RL, de Souza Ramos EA, Klassen G, Carlos RM, Correia Cadena SMS, Acco A. Ruthenium complex exerts antineoplastic effects that are mediated by oxidative stress without inducing toxicity in Walker-256 tumor-bearing rats. *Free Radic Biol Med*. 2017;110:228-39.
276. Flocke LS, Trondl R, Jakupec MA, Keppler BK. Molecular mode of action of NKP-1339 - a clinically investigated ruthenium-based drug - involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines. *Invest New Drugs*. 2016;34(3):261-8
277. Mohanraj M, Ayyannan G, Raja G, Jayabalakrishnan C. Synthesis, spectral characterization, DNA interaction, radical scavenging and cytotoxicity studies of ruthenium(II) hydrazone complexes. *J Photochem Photobiol B*. 2016;158:164-73
278. Wang JQ, Zhao ZZ, Bo HB, Chen QZ. Synthesis, characterization, and antitumor properties of ruthenium(II) anthraquinone complexes. *J Coord Chem*. 2016;69(2):177-89
279. Wang J, Zhao Z, Zhou S, Zhang X, Bo H. The antitumor effect and toxicity of a ruthenium(II) complex in vivo. *Inorg Chem Comm*.2018;87:49-52

280. Qiu K, Wang J, Song C, Wang L, Zhu H, Huang H, Huang J, Wang H, Ji L, Chao H. Crossfire for Two-Photon Photodynamic Therapy with Fluorinated Ruthenium (II) Photosensitizers. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(22):18482-92.
281. Sava G, Bergamo A, Zorzet S, Gava B, Casarsa C, Cocchietto M, Furlani A, Scarcia V, Serli B, Iengo E, Alessio E, Mestroni G. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. *Eur J Cancer*.2002;38(3):427-35
282. Cocchietto M, Sava G. Blood concentration and toxicity of the antimetastasis agent NAMI-A following repeated intravenous treatment in mice. *Pharmacol Toxicol*. 2000;87(5):193-7.