



'25

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 66
бр. 3 (јун)

YU ISSN 04406826
UDC 54.011.93



Век од рођења

академика
Пауле Путанов
(1925-2014)



оснивача и дугогодишњег руководиоца
Одељења за катализу ИХТМ у Београду

П. Путанов

Хемијски Преглед
hp.shd.org.rs

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Editor-in-Chief
DRAGICA D. TRIVIĆ
Deputy Editor-in-Chief
VESNA D. MILANOVIĆ
MAŠTRAPOVIĆ
Honorary editor
RATKO M. JANKOV

Volume 66
NUMBER 3
(June)

Publisher
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

број 3
јун

Годиште 66

Издаје
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК
Драгица Д. Тривић

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ УРЕДНИКА
Весна Д. Милановић Маштраповић

ПОЧАСНИ УРЕДНИК
Ратко М. Јанков

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ
Душанка М. Милојковић Опсеница, Тамара Р.
Тодоровић, Игор М. Опсеница, Милан Р. Николић,
Ксенија Стојановић, Александра Дапчевић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР
Иван Гутман, Душан Сладић, Снежана Зарић, Сузана
Јовановић Шанта, Драган Марковић, Радомир Саичић,
Мелина Калагасидис Крушић, Живорад Чековић
(председник)

Web site: <https://hp.shd.org.rs/>

e-mail редакције: hempred@chem.bg.ac.rs

Припрема за штампу и штампа:
РИЦ графичког инжењерства
Технолошко-металуршки факултет
Београд, Карнегијева 4

Насловна страна:
Слободан и Горан Ратковић
RatkovicDesign
www.ratkovicdesign.net
office@ratkovicdesign.net

Напомена о одговорности

Ставови, мишљења и закључци изнети у објављеним радовима представљају искључиво личне ставове аутора и не одражавају нужно ставове или политику Српског хемијског друштва. Као издавач часописа *Хемијски преглед*, Српско хемијско друштво не сноси одговорност за садржај објављених чланака.

САДРЖАЈ

ЧЛАНЦИ

Миљан БИГОВИЋ, Софија ВУЧУРОВИЋ, Марија
КАЛУЂЕРОВИЋ, Јована ЈОВАНОВИЋ, Ана РАКОЧЕВИЋ
Miljan BIGOVIĆ, Sofija VUČUROVIĆ, Marija KALUĐEROVIĆ,
Jovana JOVANOVIĆ, Ana RAKOČEVIĆ
МЕТАЛИ ИЗМЕЂУ ЖИВОТА И СМРТИ
METALS BETWEEN LIFE AND DEATH _____ 58

Теодора ЋАТО, Миодраг ВУКОВИЋ, Милена ЧАВИЋ
Teodora ČATO, Miodrag VUKOVIĆ, Milena ČAVIĆ
ПРИМЕНА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ У ОНКОЛОШКОЈ
ДИЈАГНОСТИЦИ И НАУЧНИМ ИСТРАЖИВАЊИМА
LIQUID BIOPSY APPLICATION IN CANCER DIAGNOSTICS
AND SCIENTIFIC RESEARCH _____ 65

Бранислав КОКИЋ
Branislav KOKIĆ
ОДАБРАНИ НАПРЕЦИ У ОРГАНСКОЈ ХЕМИЈИ У
ПРВОМ КВАРТАЛУ 2025. ГОДИНЕ
SELECTED ADVANCEMENTS IN ORGANIC CHEMISTRY
PUBLISHED IN THE FIRST QUARTER OF 2025 _____ 78

ВЕСТИ из / за ШКОЛЕ

Ивана МИЋИЋ
Ivana MIĆIĆ
ХЕМИЈСКИ ИНКУБАТОР: ПРОЈЕКТНА НАСТАВА У
ХЕМИЈИ
CHEMICAL INCUBATOR: PROJECT-BASED LEARNING IN
CHEMISTRY _____ 80



УВОДНИК

Драги читаоци *Хемијској љепеле*,

Пред вама је број три часописа у 2025. години. Број је припреман током периода који се означава као летњи школски распуст. Међутим, док је распуст заиста у току у основним и средњим школама након, од школе до школе, различито завршавањем другог полугодишта школске 2024/25. године, на факултетима се интензивно одвија настава у летњем семестру. У првом летњем месецу најпре је завршена настава из зимског семестра ове школске године. Изгледа да је све у реду - период реализације летњег семестра сада потпуно одговара његовом називу. Форма је усаглашена, а суштина ће да чека нове школске године.

Лепа вест је да су на 57. Међународној хемијској олимпијади, одржаној у Дубају од 5. до 14. јула 2025. године, сви такмичари из Србије награђени медаљама. **Јанко Поповић**, ученик Математичке гимназије у Београду, освојио је сребрну медаљу, а бронзане медаље су освојили **Урош Младеновић**, ученик Гимназије у Крушевцу, **Лука Шврака**, ученик Гимназије Исидора Секулић у Новом Саду, и **Андреј Дробњаковић**, ученик Математичке гимназије у Београду. Ментори тима били су **проф. др Душан Сладић** и **доц. др Душан Маленов** са Универзитета у Београду – Хемијског факултета. На Међународној хемијској олимпијади ове године је учествовало 354 такмичара из 90 земаља. Честитамо нашем тиму!

Миљан Биговић са Природно-математичког факултета Универзитета Црне Горе у Подгорици, **Софија Вучуровић** из Гимназије „Стојан Церовић” у Никшићу, **Марија Калуђеровић** са Природно-математичког факултета Универзитета Црне Горе у Подгорици, **Јована Јовановић** са Института за лекове и медицинска средства у Подгорици и **Ана Ракочев** са Металуршко-технолошког факултета Универзитета Црне Горе у Подгорици, написали су чланак под насловом *Метали између живота и смрти*. У чланку ћете пронаћи неке податке из историје о координационим једињењима, о механизмима интеракције комплекса са ћелијама канцера и на чему се заснивају нови приступи хемиотерапији. Сазнаћете о антитуморски активним комплексима метала са централним јонима платине, паладијума и рутенијума, и њиховом дејству. Можете да прочитате и о комплексима титана, гвожђа и злата који су показали одређена антитуморска својства.

Теодора Ђато, Миодраг Вуковић и Милена Чавић са Института за онкологију и радиологију Србије, припремили су чланак под насловом *Примена течне биопсије у онколошкој дијагностици и научним истраживањима*. У чланку можете да прочитате о течној биопсији, као алтернативи инвазивној биопсији ткива, којом се из телесних течности изолују биомаркери (циркулишуће туморске ћелије, циркулишуће слободне нуклеинске киселине и екстрацелуларне везикуле), да би се на основу анализе њиховог генетичког или протеинског садржаја прикупили подаци о пореклу, саставу и механизму еволуције тумора. У раду ћете сазнати о најбоље истраженим аналитима течне биопсије, о примени течне биопсије за рану детекцију малигних болести и релапса, за дијагнозу болести и прогнозу, детекцију потенцијалних терапеутских мета и механизма резистенције на терапију, као и о најважнијим резултатима истраживања клиничке примене у области онкологије у свету и у Србији.

Бранислав Кокић из Иновационог центра Хемијског факултета у Београду, за вас је направио нови избор научних радова и укратко их приказао у чланку под насловом *Одабрани најреци у органској хемији у првом кварталу 2025. године*. У раду можете прочитати о новој синтези алкалоида ибобаина која започиње из лако доступног и јефтиног пиридина, затим о превазилажењу ограничења једне класичне органске реакције и добијању диазонијум-соли алифатичних амина и, на крају, о првом изоловању формиљум-јона, реактивног катјона и краткоживећег интермедијера у неким реакцијама.

У рубрици Вести из/за школе можете прочитати чланак под називом *Хемијски инкубатор: пројектна настава у хемији*, који је припремила **Ивана Мићић**, професорка хемије у Гимназији Ивањица. Осмишљен је контекст који има потенцијал да учини релевантним и практично применљивим знања и вештине које се формирају учењем хемије. У тај контекст смештене су пројектне активности, а све је чврсто повезано с исходима из наставног програма хемије за 1. разред гимназије, као и с међупредметним компетенцијама. Може се рећи да Иванини ученици баш имају прилику да уживају у учењу хемије.

Драгица Д. Тривић



ЧЛАНЦИ



Миљан БИГОВИЋ¹, Софија ВУЧУРОВИЋ², Марија КАЛУЂЕРОВИЋ¹, Јована ЈОВАНОВИЋ³, Ана РАКОЧЕВИЋ⁴

¹Природно-математички факултет Универзитета Црне Горе, Подгорица, ²Гимназија „Стојан Церовић”, Никшић, ³Институт за лекове и медицинска средства, Подгорица, ⁴Металуршко-технолошки факултет Универзитета Црне Горе, Подгорица

Е-пошта: miljan@ucg.ac.me; vucurovicsofija@gmail.com; marijakaludjeric.9@gmail.com; jokicajoka1212@gmail.com; arakocevic01@gmail.com

МЕТАЛИ ИЗМЕЂУ ЖИВОТА И СМРТИ

ИЗВОД

Координациона једињења су се користила кроз историју медицине за лијечење различитих болести, укључујући канцер. Од открића цисплатина 1965. године, велики број комплекса метала са централним јонима метала попут платине, рутенијума, злата или бакра је дизајниран, синтетисан и тестиран, како би се развили клинички ефикасни и безбједни лекови. У овом раду је приказан детаљан преглед комплекса метала са антитуморском активношћу почев од цисплатина, па до неких нових потенцијалних лекова који су дио клиничких испитивања. Осврнули смо се и на неке савремене методе помоћу којих на основу саме структуре можемо предвидјети дејство, али смо и навели бројне мане свих ових једињења и приказали каква је будућност координационих једињења у лијечењу рака.

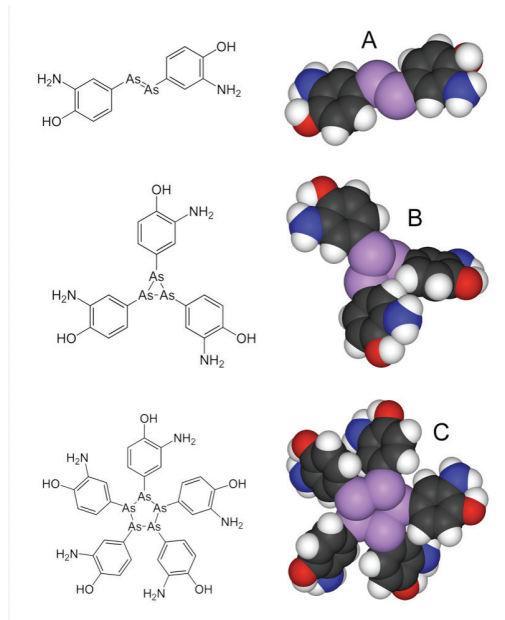
Кључне ријечи: комплексна једињења, канцер, палатијинска група метала, циљана терапија

УВОД

Метали су кроз историју кориштени на разне начине у медицини, много прије него што је наука изучила лековита својства ових супстанци. Као примјер можемо издвојити преко 7000 година стару ајурведску медицину, која потиче из Индије и од давнина служи се металима попут злата, бакра, олова и живе (Ghalib et al., 2011).

Савремена хемија која се примјењује у медицини има за циљ да пронађе молекуле који имају добре биолошке ефекте. Комплекси метала су од давнина коришћени у медицини, иако до почетка 20. вијека употреба координационих једињења није била научно призната и схваћена. Арсфенамин (Слика 1) био је први успјешно изоловани комплекс. Он је данас познат као једињење 606 (Rahman & Sarker, 2020). До проналаска пеницилина служио је као лијек против сифилиса. Упркос овом открићу, потпуни значај комплексних једињења није

откривен до проналаска цисплатине шездесетих година 20. вијека. Ово откриће промијенило је свијет медицине и отворило врата координационој хемији. Данас су лекови на бази комплексних једињења попут карбоплатина, оксалиплатина и наравно цисплатина, неизоставне компоненте хемотерапијских лекова. По одређеним истраживањима, приближно 50 % терапија против рака укључивало је комплексе платине (Khoury et al., 2020).



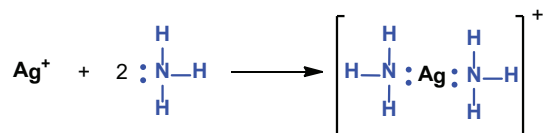
Слика 1. Структура арсфенамина, једињења које је кориштено као хемотерапијски агенс (<https://en.wikipedia.org/wiki/Arsphenamine>)

КОМПЛЕКСИ

Прва забиљежена примјена комплексних једињења у науци ипак долази много касније. Године 1597. Андреас Либавијус је доказао да плава боја настаје када у кон-

такт ступе амонијум-хлорид и месинг због формирања комплексног катјона чија је формула $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Пионир координационе хемије био је швајцарски научник Алфред Вернер, (1866–1919), дијете индустријске револуције. Вернерови проналасци означили су почетак истраживања координационих једињења и њихових различитих својстава. Његово научно наслеђе помогло је у обликовању хемије какву данас познајемо. Због својих истраживања, награђен је Нобеловом наградом 1913. године.

Комплексна једињења су врста хемијских једињења у којима је остварена координативно-ковалентна веза најчешће између јона метала и анјона, или јона метала и молекула који имају макар један слободан електронски пар. Она се састоје из унутрашње и спољашње сфере. Централни јон метала је градитељ комплекса и игра улогу Луисове киселине, односно електронакцептора. Анјони попут Cl^- , I^- , CN^- , OH^- и молекули попут H_2O и NH_3 су лиганди. Лиганди морају посједовати макар један слободан електронски пар, зато што су они доноси електрона. Функционишу као Луисове базе (Bigović & Varagić, 2021). На примјер, у реакцији јона сребра са амонијаком настаје координативна хемијска веза по доносско-акцепторском механизму приказаном на следећој слици (Слика 2):



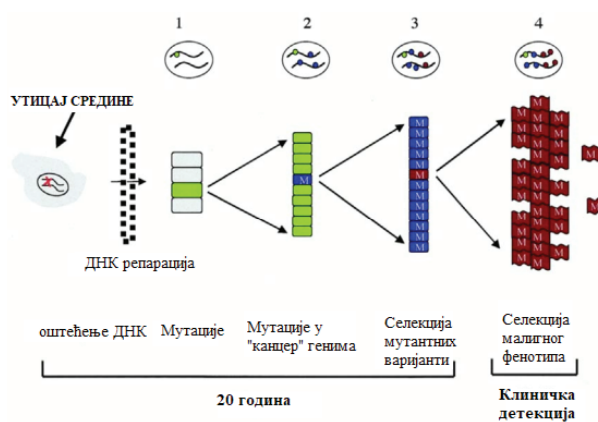
Слика 2. Примјер добијања координационог једињења

ТУМОРИ

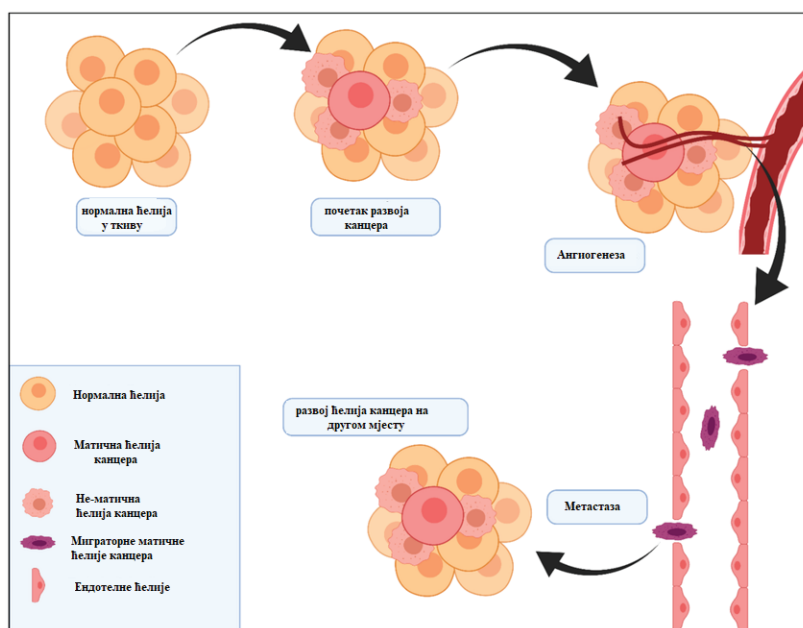
У својој основи, канцер је болест до које долази када се абнормалне ћелије у тијелу неконтролисано дијеле и почињу да угрожавају и уништавају нормално тјелес-

но ткиво. Та диоба је проузрокована мутацијама у ћелијској ДНК. Канцер је болест изазвана промјенама на генима који су задужени за контролу раста, диобе и смрти наших ћелија (Слика 3). Узроци појављивања ових генетских промјена су вишеструки - од утицаја животне средине до клиничке историје наших породица.

Тумори су једино канцерогени ако су малигни. До малигне трансформације долази тако што ћелије претрпе неколико абнормалних промјена ДНК (Слика 4). Тада ћелије канцера нападају сусједне ћелије и размножавају се алармантним темпом. То се може догодити као примарни процес у неком нормалном ткиву, али и као малигна дегенерација бенигног тумора. Крвоток и лимфни систем могу да преносе неке ћелије рака из примарног тумора на друге локације. Наш имуни систем може да уклони абнормалне ћелије процесом апоптозе, али ћелије рака често остану непримјећене.



Слика 4. До оштећења ДНК долази због разних спољашњих и унутрашњих фактора, а велики број мутација превазилази способност ћелијског система да се излјечи. Повећана стопа мутација и клонална експанзија доводе до настанка малигног фенотипа, а у неким случајевима и до метастазе (Loeb, 2001).



Слика 3. Формирање неопластичних матичних ћелија и механизам настанка канцера и његових метастаза (Chmurska et al., 2021)

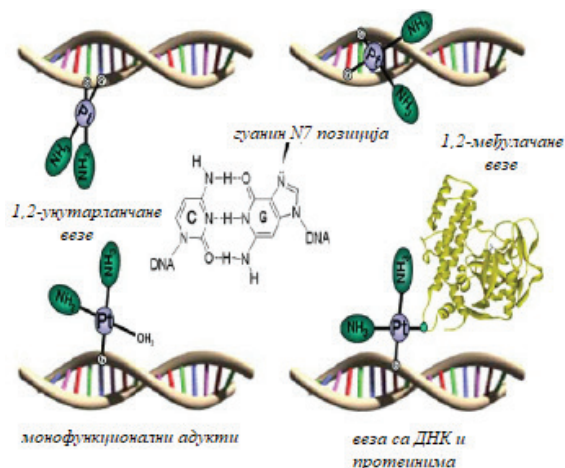
Канцери се дијеле на неколико врста заснованих на типу ћелија од којих потичу. Групе укључују: 1. карциноме – потичу од епителних ћелија које образују слој ткива на површини тијела; 2. саркоме - од мезенхималних ћелија везивног ткива; 3. леукемије и лимфоме - од ћелија хематопоетског ткива које производе крвне ћелије; 4. меланоме - од меланоцита, ћелија које се налазе у кожи и другим дјеловима тијела; 5. неуроектодермални тумори - од ћелија ембрионалног неуроектодерма који формирају компоненте централног и периферног нервног система (Vogelstein & Kinzler, 2004).

МЕХАНИЗМИ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА ЋЕЛИЈАМА КАНЦЕРА

Разноврсна структурна сложеност и полиморфна природа ДНК омогућавају велики број потенцијалних интермолекуларних интеракција. Степен варијабилности координационих једињења прелазних метала који зависи од метала, оксидационог стања, лиганда, укупне величине и облика комплекса, омогућава висок степен селективности према разним биолошким метаболитима. Класични органски лекови и њихове могућности ограничене су могућностима угљеника да гради три врсте веза које имају карактеристичну геометрију: **линеарну** (sp -хибридизација), **тригонално планарну** (sp^2 - хибридикација) и **тетраедарску** (sp^3 - хибридикација). Употреба прелазних метала у медицини, омогућава синтезу комплекса са октаедарским центром и шест супституената, који може да формира чак 30 стереоизомера. Како бисмо схватили истинску разлику између ових примјера, морамо се сјетити да асиметрични тетраедарски атом угљеника у окружењу четири различита супституента може да да укупно два стереоизомера. Број могућих стереоизомера описује способност метала да гради тродимензионалне структуре и на тај начин повећа број могућих интеракција са биомолекулима (Kamčeva, 2013). Нови приступи хемотерапији се заснивају на синтези комплекса метала који селективно **инхибирају ћелијске ензиме** важне за раст и развој тумора. Примјер је интеракција комплекса метала са циклооксигеназама и другим проинфламаторним ензимима. Величина, стереохемија, редокс потенцијал, расподјела наелектрисања и друга својства металних хелата могу се измијенити лако током хемијске синтезе. Интеракције између ДНК и комплекса метала указују на то да координациона геометрија метала и распоред лиганда значајно утичу на способност комплекса да се веже за ДНК. На примјер, квадратно-планарни комплекси дозвољавају дубље уметање оваквог интеркалатора у поређењу са октаедарским или тетраедарским једињењима (Karges et al., 2021).

ДНК је критична терапијска мета која је одговорна за, и у центру фокуса широког спектра интраћелијских интеракција. На примјеру молекула ДНК уочавамо више мјеста гдје се платина и други метали могу везивати: за атоме кисеоника у рибози или фосфатној групи, као и за атоме кисеоника и азота у пуринским и пиримидинским базама. Најчешћа мјеста везивања (Слика 5) су свакако

N3 позиције на цитозину, тимину и урацилу и N7 позиције на аденину и гуанину (Pages et al., 2015).



Слика 5. Сликровити прикази начина на који се комплекси платине (Pt) везују за молекуле ДНК (Fahmy & Gharib, 2014)

Истраживања Липарда (Stephen Lippard) и његовог тима објаснила су утицај комплекса платине на репаративне механизме ДНК. Откривено је да протеини који садрже одређену секвенцу аминокиселина могу много боље да вежу адукте Pt-ДНК од обичних молекула ДНК. Ови протеини се називају **протеини са групама високе мобилности** (ХМГ - high mobility groups). Протеини са ХМГ доменом се вежу за Pt-ДНК адукте *in vitro*, док је *in vivo* доказано да су генетски модификоване ћелије, без гена за синтезу ових протеина, мање сензитивне на цисплатину (Kamčeva, 2013).

Нековалентне интеракције са ДНК, као што су интеркалација или грађење водоничних веза, показале су се подједнако важне као ковалентне интеракције, јер се преко њих може испољавати цитотоксичност комплекса метала. Уметање позитивно наелектрисаног полицикличног ароматичног молекула између два сусједна пара база ДНК познато је као **интеркалација**. Ово уметање је стабилизовано π - π „стекинг” интеракцијама између базних парова и система ароматичних прстенова, које резултира продужењем или одмотавањем спирале ДНК. Интрекалација је реверзибилна и стабилизована је комбинацијом водоничних веза, електростатичких, ентропских, ван дер Валсових и хидрофобних интеракција. У уобичајене органске интеркалаторе убрајамо **фенантролине, фенантридине, акридине, антрахиноне и антрацене**. Планарни ароматични хетероциклични лиганди, као што су фенантролин или терпиридин, могу се „заглавити” између пара азотних база у молекулу ДНК захваљујући дипол-дипол интеракцијама. Комплекси платине који се интеркалирају са ДНК обично показују активност против рака. Значајни су комплекси структуре $[Pt(I)(A)]$ гдје је I интеркалирајући лиганд, а A је неинтеркалирајући помоћни лиганд. Позитивно наелектрисање комплекса такође игра значајну улогу јер омогућава побољшану растворљивост, селективни унос у ћелије путем активног транспорта и висок афинитет за ДНК. Поред тога, независне промјене I и

А могу да модификују и биолошку активност. Познато је да су метил супституенти на петој и шестој позицији у фенантролину посебно ефикасни, при чему неки комплекси постижу цитотоксичност при наномоларним концентрацијама (Pages et al., 2015)

Између координисаних лиганата и полинуклеотида се преко атома кисеоника у фосфатним групама на молекулу ДНК стварају **водоничне везе**. На примјер, уколико лиганди комплекса садрже аминок групе, атом водоника из аминок група гради водоничне везе са атомом азота из пуринских база или атомом кисеоника из фосфата (Kamčeva, 2013).

Редокс реакције метала са полинуклеотидима представљају посебну врсту интеракција у којима присуство метала може модификовати молекул ДНК и без претходног ковалентног везивања или интеркалације. Значајан је примјер Фентонове реакције у којој двовалентно гвожђе у присуству H_2O_2 (водоник-пероксида) производи хидроксилне радикале и дјелује на ДНК тако што прекида његов шећерно-фосфатни скелет. Из перспективе реверзибилности, посебно су занимљиве **хидролитичке реакције** у присуству јона метала. У редокс реакцији, оксидовањем шећера, долази до одвајања фрагмента шећера и азотне базе од полимера ДНК, који је затим немогуће директно вратити у претходно стање, за разлику од хидролитичке реакције. Ланац се хидролитички може прекинути у присуству комплекса рутенијума (Kamčeva, 2013).

ПЛАТИНА - Pt

Платина је сребрнато-бијели племенити метал, члан шест прелазних елемената у Периодном систему који су познати као платински метали (рутенијум, родијум, паладијум, осмијум, иридијум и платина). Уобичајено оксидационо стање за платину је +2 и +4. У складу са осталим члановима платинске групе, метал показује прилично јаку тенденцију да формира комплексе. За платину(II) је типична dsp^2 хибридација, што значи да најчешћи комплекси платине(II) имају квадратно-планарну структуру и дијамагнетични су. Антитуморски комплекси платине(II) у својој структури морају посједовати два монодентатна анјонска лиганда, или један бидентатни лиганд, који су слабом везом координовани за платину (тзв. leaving ligands). Ови лиганди се у ћелији супституишу са донорским атомима из ДНК. Комплекси код којих су анјонски лиганди јаком везом координовани за платину не показују антитуморску активност, док су комплекси са слабо везаним анјонима као што су NO_3^- и ClO_4^- обично изузетно токсични. Када је молекул воде координован за платину комплекс је активан једино у случају када се дозира заједно са zasiћеним раствором NaCl, што се доводи у везу са грађењем

одговарајућег хлоро-комплекса (Savić, 2014).

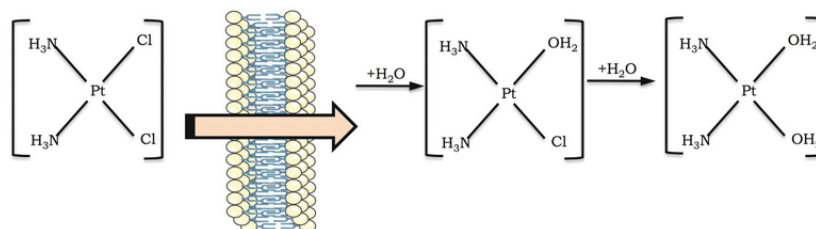
ЦИСПЛАТИН

Комплекси платине су најзначајнији у антитуморским терапијама данашњице. Издвајамо цисплатин и трансплатин, диаминдихлорплатина(II), два изомера квадратно-планарне геометрије. Цисплатин је прилично нестабилан стога се углавном даје интравенозно и реагује са албумином из крви, хемоглобином и трансферином. При третману, највеће концентрације су примећене у бубрезима, јетри и простати, значајно мање у мишићима, тестисима и панкреасу. Повећање концентрације цисплатина везује се са редукцијама тумора и побољшањем клиничких параметара. Структурно, цисплатин се састоји од јона платине везаног за два хлоридна јона и двије аминок групе распоређене квадратно. Аминок групе дјелују као главни лиганди, док хлориди функционишу као одлазеће групе. Распоред хлоридних јона је такав да се налазе један поред другог у цисплатину, што је биолошки битно. Транс изомер овог једињења се значајно разликује. Насупрот цисплатина, трансплатин не посједује антитуморска својства (Savić, 2014).

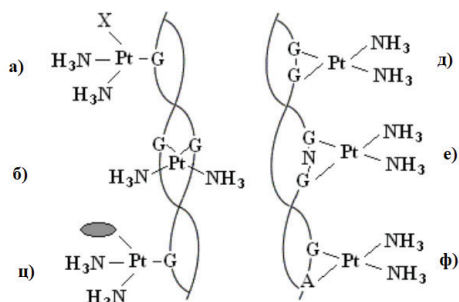
Постоји више претпоставки о томе зашто платина(II)-комплекси транс-геометријске конфигурације не показују ова својства. Основни разлог лежи у чињеници да су они знатно реактивнији у односу на одговарајуће *cis*-изомере. Тако *trans*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ комплекс хидролизује четири пута брже у односу на *cis*-геометријски изомер па је његова реактивност у организму знатно већа. Ово, такође, има за посљедицу да комплекси *trans* геометријске конфигурације не показују селективност у антитуморском дјеловању (Savić, 2014).

Цисплатин у цитоплазми хидролизује и долази до супституције хлоридног јона водом (Слика 6), формирајући $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$. Оштећење ДНК изазива активацију p53 протеина, који би могао да регулише ћелијску смрт супротстављањем анти-апоптотичкој функцији Б-ћелијског лимфома, деградацијом инхибиционог протеина сличног пахуљици, итд. Оштећење ДНК, доводи до способности цисплатина да створи реактивне врсте кисеоника које могу изазвати ћелијску смрт (Dasari & Tchounwou, 2014).

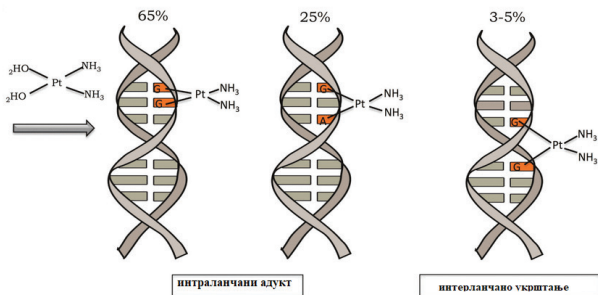
Могуће везе комплекса цисплатине и ДНК приказане су на сљедећој слици (Слика 7) и укључују: а) монофункционалну везу комплекса и гуанина, б) интерланчану везу са два гуанина, ц) везу комплекса са протеином и гуанином, д) претходно поменућу везу са два гуанина, е) интерланчану везу са два гуанина раздвојену са једном или више база, ф) већ наведену интерланчану везу са сусједним аденином и гуанином (Слика 8) (Kamčeva, 2013).



Слика 6. Хидролиза цисплатина (Rocha et al., 2018)



Слика 7. Типови веза које цисплатин може да гради са ДНК (Kamčeva, 2013)

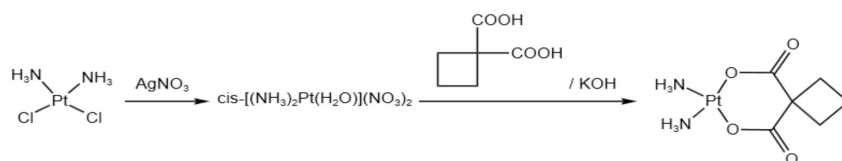


Слика 8. Најчешће везе које цисплатин формира са молекулом ДНК (Rocha et al., 2018)

Цисплатин се показао као веома ефикасан хемотерапеут, нарочито у терапији рака јајника и тестиса, међутим главни недостаци овог комплекса су токсичност за виталне органе и развијање ћелијске резистенције. Механизам развоја ћелијске резистенције није познат, али се зна да више фактора утиче на промјену сензитивности ћелије на цисплатину. Ћелијску резистенцију карактерише смањена апсорпција лијека у ћелијама, повећан рефлекс и инактивација комплекса биомолекулима који посједују тиолне групе. Осим тога, значајну улогу има и промијењена експресија регулаторних протеина укључених у ћелијску сигнализацију и контролу апоптотских механизма, као и промијењена концентрација ензима за репарацију ДНК молекула (Rocha et al., 2018).

КАРБОПЛАТИН

Карбоплатин је развијен раних 1970-их година како би се побољшали клинички учинци прве генерације лијека са платином. Карбоплатин је лијек који се може користити у терапији бројних типова канцера, а најчешће се примјењује код канцера јајника и плућа. Он садржи бидентатни дикарбоксилатни хелат (Слика 9) као одлазећи лиганд – захваљујући структури овог лиганда много је мање реактиван од цисплатина, због тога што је



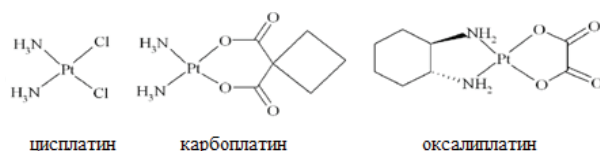
Слика 9. Добијање карбоплатина, полазећи од цисплатина (https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Carboplatin_synthesis.png)

1,1-циклобутан-дикарбоксилат слабија одлазећа група него хлоридни јон који је присутан у цисплатину.

Карбоплатин је антинеопластик у класи алкилујућих агенаса. Средства за алкиловање функционишу помоћу три различита механизма: (1) везивање алкил-група за ДНК базе, што као последицу има фрагментацију ДНК ланца помоћу ензима за поправку у њиховим покушајима да замијене алкиловане базе, спречава синтезу ДНК и транскрипцију РНК из погођене ДНК; (2) оштећење ДНК путем формирања „cross links” које спречавају да се ДНК одвоји за синтезу или транскрипцију; и (3) индукција погрешног спајања нуклеотида што доводи до мутација (Stewart, 2007). Интересантно је да је механизам дјеловања цисплатине и карбоплатине сличан, али је установљена унакрсна резистенција, односно канцери резистентни на цисплатину, резистентни су и на карбоплатину (Rabik & Dolan, 2007)

ОКСАЛИПЛАТИН

Оксалиплатин је координационо једињење платине које је најновије међу комплексима платине који се користе у борби против ћелија тумора. Оксалиплатин се разликује од цисплатина по томе што су амино групе цисплатина замијењене диаминциклохексаном (DACH). Његов пуни хемијски назив, по IUPAC номенклатури, *cis-L*-диаминциклохексаноксалатоплатина(II), означава присуство оксалатне групе, које су одлазеће у овом комплексу, и лиганда DACH, који су одговорни, макар дјелимично, за његова јединствена својства. На примјер, за разлику од цисплатина, оксалиплатин (Слика 10) у цитоплазми брзо доживљава неензимску трансформацију у реактивна једињења због помјерања оксалатне групе, и то је процес који компликује његов фармакокинетички профил (Alcindor & Beauger, 2011).



Слика 10. Структурне формуле најзначајнијих координационих једињења која садрже платину (Kamčeva, 2013)

Органи који се циљају лековима са оксалиплатином у највећем броју случајева припадају хематопоеетском систему, периферним нервима и гастроинтестиналном (ГИ) систему. Користи се са леуковорин калцијумом и флуороурацилом ради побољшања ефикасности лијечења код пацијената који пате од колоректалног карцинома који је настао метастазом (André et al., 2004)

ПАЛАДИЈУМ – Pd

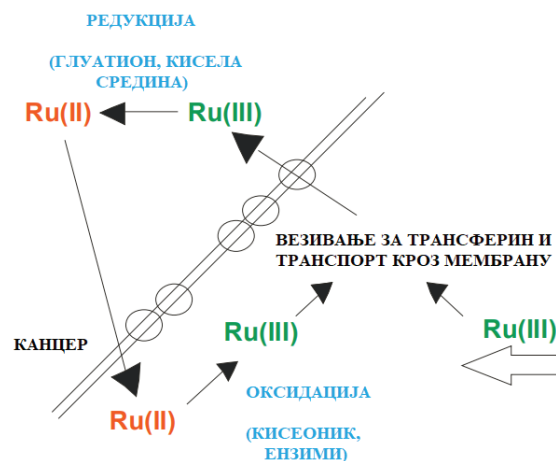
Паладијум је сребрно-бијели, свијетли метал. Јавља се у два оксидациона стања, +2 и +4. Због сличних својстава гради слична једињења као и платина. Са d^8 електронском конфигурацијом долази до dsp^2 хибридизације, па је типична квадратно-планарна структура комплекса овог метала са координационим бројем 4. Окарактерисан је као мека Луисова киселина, па самим тим очекивано формира јаче везе са азотним или сумпорним донорским лигандима (меке Луисове базе), него са кисеоником као донором (тврда Луисова база).

Комплекси паладијума(II) су у термодинамичком смислу умјерено стабилни, док су у кинетичком смислу лабилни – лако измјењују лиганде. Упркос томе, добро су проучени и одиграли су важну улогу у развоју координационе хемије. Добро су проучени сви геометријски изомери за овај тип комплекса и механизам измјене лиганата баш на комплексима овог метала са координационим бројем 4. Комплекси паладијума могу се категорисати у двије групе. Прву групу чине једињења са једним атомом паладијума у језгру, праћена лигандима са доказаном биолошком активношћу, као што су аналози пиридина или хинолина. У другу групу спадају молекули са два атома паладијума у језгру, а селекција лиганда се заснива на потенцијалним терапијским својствима. Ови деривати комплекса паладијума, ступају у интеракцију са ДНК ћелијама канцера, формирајући и ковалентне и нековалентне везе (Rakić, 2017).

РУТЕНИЈУМ- Ru

Љекови на бази рутенијума су центар интересовања и многих значајних истраживања због њихових богатих анти-туморских својстава. Кинетика лигандне измјене одређује биолошку активност комплекса метала и његову интеракцију са макромолекулама, као што су протеини и мањи биомолекули, S-донори. Параметри кинетике лигандне замјене за комплексе Ru(II) и Ru(III) су слични онима за комплексе Pt(II). То је мотивисало истраживаче да развију терапије које се разликују од стандардних. Из тога се развила такозвана **рутенотерапија**.

Комплекси Ru(III) су биолошки инертнији од аналогних Ru(II) и Ru(IV) комплекса, а посебно је интересантна чињеница да под утицајем средине могу промијенити своје оксидациона стање. Глутатион, аскорбат и протеини са једноелектронским трансфером су редукциона средства за Ru са вишим оксидационим бројем, а молекулски кисеоник и цитохром оксидују Ru(II). Редокс потенцијал комплекса рутенијума различитог оксидационог стања (Слика 11) представља основу за ефикасност хемотерапију. Идеја је да се љекови синтетишу као релативно инертни комплекси Ru(III), који би се активирали редукцијом у киселиној средини, са мањом концентрацијом кисеоника и повећаном концентрацијом глутатиона, као што је случај са ћелијама канцера. Редокс процес је реверзибилан, па би се активни комплекс Ru(II) у нормално прокрвљеним ткивима са већом концентрацијом кисеоника, оксидовао до инертног комплекса Ru(III) (Schluga et al., 2006).



Слика 11. Промјена оксидационог стања рутенијума у здравом и ткиву канцера. Ru(III) комплекси су прољекови, који се у редуктивној средини (тумор) трансформишу у реактивне Ru(II) комплексе (Kamčeva, 2013)

КОМПЛЕКСИ ДРУГИХ МЕТАЛА СА АНТИКАНЦЕРОГЕНИМ ДЕЈСТВОМ

Поред комплекса платине и метала платинске групе, координациона једињења многих других метала су показала одређена антитуморска својства. Иако нијесу толико детаљно истражени колико и поједини комплекси који се већ дуже вријеме користе у разним терапијама, њихове јединствене предности се не смију занемарити.

Комплекси **титанијума** - Ti, будотитан и титаноцен-дихлорид, су у преклиничким студијама показали активност према различитим врстама канцера. Међутим, наведени комплекси су слабо растворљиви у води, хидролитички нестабилни у физиолошким условима и чак 70-80 % укупне примљене количине се веже за протеине плазме (Trudu et al., 2015).

Први комплекси **гвожђа** - Fe са антитуморским дејством су били фероценијум-пикрат и фероценијум-трихлороацетат. Цитотоксичност фероценијумских соли се заснива на формирању реактивних кисеоничних врста и стварању оксидативног стреса, па они посредно дјелују на ДНК. Посебну класу комплекса гвожђа чине гвожђе карбонил нуклеозиди, за које је доказано да изазивају програмирану смрт ћелија (Trudu et al., 2015).

Фосфино комплекси **злата** - Au (ауранофин) су се најприје користили у третманима реуматоидног артритиса. Међутим, касније је доказана и њихова активност на раст туморских ћелија у култури и *in vivo*. Другу групу комплекса злата чине комплекси са дифенилфосфиноетанским лигандима, као што је комплекс $[Au(dppe)_2]Cl$. Осим што реагује са молекулом ДНК, овај комплекс мијења мембрански потенцијал митохондрија, повећавајући њихову респирацију и пермеабилност (Trudu et al., 2015). Познат је такође велики број комплекса бакра, кобалта и других прелазних метала чији комплекси показују значајну антитуморску активност и који се детаљно истражују.

БУДУЋНОСТ У ЛИЈЕЧЕЊУ КАНЦЕРА ЛИТЕРАТУРА

Нанотехнологија је значајно унаприједила систем за производњу лекова, а и у великој мјери обезбјеђује средства која користимо за директну испоруку лијека до циљаног мјеста. Тако се у највећем дијелу смањују нежељени споредни ефекти. Уопштено у медицини, а поготово у лијечењу канцера, напредну биодоступност, *in vivo* стабилност, пријевну апсорпцију, растворљивост, континуирану и циљану испоруку и терапијску ефикасност неколико лекова против канцера обезбјеђују наночестице (NP-nanoparticles). Основни циљ којем тежимо при развоју и дизајнирању система за контролисану доставу терапеутских средстава је **циљана терапија** – помоћу ње се врши достављање лекова до тачно одређених обољелих ткива и органа. Када се лијек достави тачно на мјесто гдје је фармаколошко дејство потребно и пожељно, друга ткива се не оштећују примјењеном терапијом (Díaz & Vivas-Mejía, 2013).

Abstract

METALS BETWEEN LIFE AND DEATH

Miljan BIGOVIĆ¹, Sofija VUČUROVIĆ², Marija KALUDEROVIĆ¹, Jovana JOVANOVIĆ³, Ana RA-KOČEVIĆ⁴

¹Faculty for Natural sciences and Mathematics, University of Montenegro, Podgorica; ²Gymnasium „Stojan Cerovic”, Niksic, ³Institute for medicines and medical devices, Podgorica ⁴Faculty of Metallurgy and Technology, University of Montenegro, Podgorica

Metal coordination complexes have been used throughout the history of medicine to treat various diseases, including cancer. Since the discovery of cisplatin in 1965, a large number of metal complexes, with central metal ions such as platinum, ruthenium, gold or copper, have been designed, synthesized and tested, in order to develop clinically effective and safe drugs. Currently, numerous papers cover the applications of cytostatic metal complexes, highlighting the most promising examples of platinum and non-platinum compounds in preclinical and clinical trials. However, recent comprehensive reviews covering the chemical and biological aspects of metal coordination compounds in cancer therapy are still rare. This paper presents a detailed review of metal complexes with antitumor activity, starting with cisplatin and ending with some new drugs that are part of clinical trials. We looked at some modern methods by which we can predict the effect based on the structure itself, but we also listed the numerous flaws of all these compounds and showed what the future of coordination compounds in cancer treatment is like.

Keywords: complex compounds, cancer, platinum group metals (PGMs), target therapy

- Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*, 18 (1), 18-25.
- André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, 350 (23), 2343-2351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032709>
- Bigović, M., & Varagić, S. (2021). *Hemija 2: udžbenik za drugi razred gimnazije*. Podgorica: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- Chmurska, A., Matczak, K., & Marczak, A. (2021). Two Faces of Autophagy in the Struggle against Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2981. <https://doi.org/10.3390/ijms22062981>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Díaz, M. R., & Vivas-Mejía, P. E. (2013). Nanoparticles as drug delivery systems in cancer medicine: Emphasis on RNAi-containing nanoliposomes. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6 (11), 1361-1380. <https://doi.org/10.3390/ph6111361>
- Fahmy, H. A., & Gharib, O. A. (2014). Effect of low radiation dose on cisplatin induced hepato-testicular damage in male rats. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 4 (9), 1053-1066.
- Galib, Barve, M., Mashru, M., Jagtap, C., Patgiri, B. J., & Prajapati, P. K. (2011). Therapeutic potentials of metals in ancient India: A review through Charaka Samhita. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 2 (2), 55-63. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.82522>
- Kamčeva, T. T. (2013). *Interakcija kompleksa platine i rutenijuma sa pankreasnom fosfolipazom A2 i fosfolipidima (Doktorska disertacija)*. Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd
- Karges, J., Stokes, R. W., & Cohen, S. M. (2021). Metal complexes for therapeutic applications. *Trends in Chemistry*, 3 (7), 523-534. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2021.03.002>
- Khoury, A., Deo, M. K., & Aldrich-Wright, R. J. (2020). Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 207, 111070. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111070>
- Loeb, L. A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Research*, 61, 3230-3239
- Pages, B. J., Ang, D. L., Wright, E. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2015). Metal complex interactions with DNA. *Dalton Transactions*, 44, 3505-3526. <https://doi.org/10.1039/c4dt03536c>
- Rahman, M., & Sarker, D. M. (2020). Antimicrobial natural products. In S. D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Vol. 55, pp. 77-113). Academic Press.
- Rakić, G. (2017). *Sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost trans kompleksa Pt(II) i Pd(II) sa piridinskim derivatima kao ligandima (Doktorska disertacija)*. Univerzitet u Beogradu- Hemijski fakultet, Beograd.
- Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo)*, 73 (suppl 1), e478s. <https://doi.org/10.6061/>

- Savic, A. R. (2014). *Kompleksi platine(II) i rutenijuma(II) sa diaminskim ligandima: sinteza, karakterizacija i citotoksičnost (Doktorska disertacija)*. Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet, Beograd.
- Schluga, P., Hartinger, C. G., Egger, A., Reisner, E., Galanski, M., Jakupec, M. A., & Keppler, B. K. (2006). Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Transaction*, 1796-1802. <https://doi.org/10.1039/b601246g>

- Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63, 12-31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001>
- Trudu, F., Amato, F., Vaňhara, P., Pivetta, T., Peña-Méndez, E. M., & Havel, J. (2015). Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *Journal of Applied Biomedicine*, 13 (2), 79-103. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.02.001>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10 (8), 789-99. <https://doi.org/10.1038/nm1087>



Теодора ЋАТО, Миодраг ВУКОВИЋ, Милена ЧАВИЋ

Институт за онкологију и радиологију Србије, Пастерова 14, Београд

**Е-пошта: teodoracato2101@gmail.com;
miodragvuk97@gmail.com; milena.cavic@ncrc.ac.rs**

ПРИМЕНА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ У ОНКОЛОШКОЈ ДИЈАГНОСТИЦИ И НАУЧНИМ ИСТРАЖИВАЊИМА

ИЗВОД

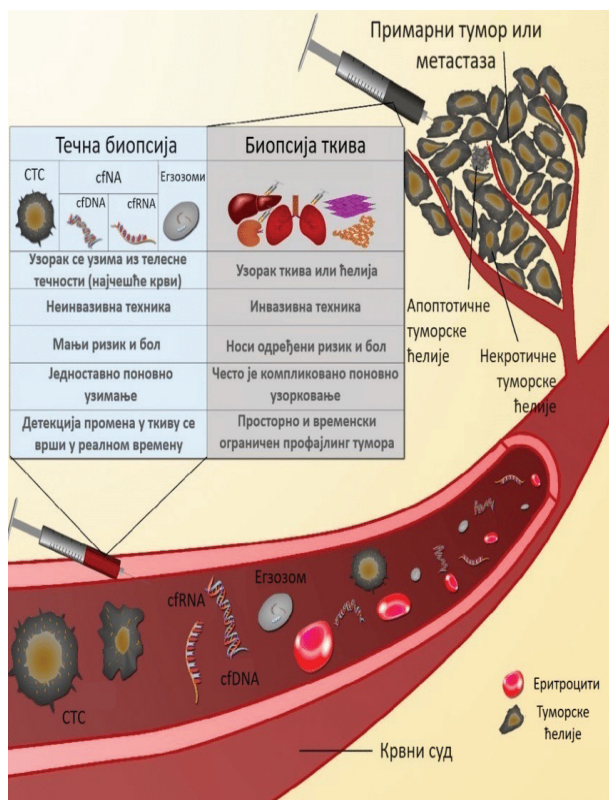
Течна биопсија се протеклих година испитивала као алтернатива инвазивној биопсији ткива, а за комплементарна испитивања карцинома већ полако проналази место у рутинској клиничкој примени. Течном биопсијом се из телесних течности, као што су крв, урин, пљувачка, плеурални излив и церебро-спинална течност, изолују биомаркери попут циркулишућих туморских ћелија, циркулишућих слободних нуклеинских киселина или екстрацелуларних везикула, након чега се анализира њихов генетички или протеински садржај. На релативно лак и једноставан начин, са могућношћу вишеструког узорковања, могуће је добити информације у вези порекла, састава и механизма еволуције тумора. Континуалним унапређивањем метода за детекцију и анализу биомаркера из течне биопсије омогућена су интензивна научна истраживања о примени течне биопсије у праћењу еволуције тумора у свим стадијумима болести и у току терапије. Обећавајући резултати указују на будућу примену у клиничкој онколошкој пракси за рану детекцију болести и релапса, дијагнозу и прогнозу, детекцију потенцијалних терапеутских мета и механизма резистенције на терапију. У овом раду описани су најбоље истражени аналити течне биопсије, као и неки од најважнијих резултата истраживања о њиховој клиничкој примени у области онкологије у свету и у Србији.

Кључне речи: биомаркер, екстрацелуларне везикуле, течна биопсија, циркулишућа слободна ДНК, циркулишуће туморске ћелије

УВОД

Карцином представља малигно обољење које карактерише неконтролисано дељење измењених ћелија. Према стопи смртности коју узрокује, налази се на дру-

гом месту у свету, након обољења кардиоваскуларног система (Malvezzi et al., 2017). Због високе инциденције обољевања, као и стопе смртности, интензивно се ради на разјашњавању механизма настајања и развоја болести, у сврху унапређивања програма превенције, ране детекције и ефикасности терапијских приступа. Анализа молекуларног профила карцинома има изузетан значај у успостављању прецизне дијагнозе и прогнозе болести, као и у одабиру одговарајућег терапијског приступа. Тренутни златни стандард у анализи молекуларног профила карцинома је биопсија ткива. Биопсија ткива, односно хируршко узимање чврстог узорка тумора, има неколико мана: инвазивна је и скупа, често и болна за пацијента, понекад ризична, могуће су и компликације услед неприступачне локације тумора (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Такође, због хетерогености тумора, као и слабијег квалитета или недовољне количине узорка, информације које се добијају могу бити некомплетне, а неопходно је и континуално праћење промена у тумору услед селективног деловања терапије и временске промене тумора. Вишеструке биопсије ткива у току и након лечења су често немогуће и некомфорне за пацијента. Течна биопсија је све чешћи, алтернативни извор узорка тумора, а огледа се у анализи циркулишућих биомаркера изолованих из телесних течности: крви, урина, пљувачке, плеуралног излива и церебро-спиналне течности (Lone et al., 2022). Течна биопсија је мање инвазивна, јефтинија и могуће је чешће узорковање, а студије су указале на могуће примене у клиничкој пракси (Слика 1). Анализом биомаркера пореклом из тумора, који се изолују из узорка течне биопсије различитим техникама, омогућено је праћење одговора на терапију, резистентности тумора на исту и прогнозе лечења. Детаљнијим испитивањима биомаркера као важних актера у многим процесима везаним за малигне ћелије може се доћи до додатних разјашњења еволуције карцинома и унапређења опција персонализоване терапије, те побољшања исхода лечења (Soda et al., 2022).



Слика 1. Разлика између биопсије ткива и течне биопсије (Модификовано према Qi et al., 2018)

Најчешће анализирани циркулишући биомаркери су циркулишуће туморске ћелије (енгл. *circulating tumor cells* – CTC), циркулишућа слободна ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина) (енгл. *cell-free DNA* – cfDNA) и екстрацелуларне везикуле (енгл. *extracellular vesicles* – EV). Ови биомаркери се ослобађају у систем за циркулацију из некротичних и апоптотичних примарних или метастатских туморских ћелија, а неки од њих су укључени у механизме који омогућавају даље метастазирање тумора у околне или удаљене органе. Управо због дијапазона информација које је могуће добити анализом циркулишућих биомаркера (мутације, информације о протеому, транскриптому, липодому, метаболу или фрагменту који су у вези са малигном болешћу, затим броју измењених копија (енгл. *copy number alterations* – CNA) кључних гена, епигенетичким варијацијама и слично (Lone et al., 2022)) у току су бројна испитивања која би побољшала рано откривање болести, дијагностику, праћење тока лечења и детекцију релапса (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Иако се испитује применљивост додатних потенцијалних биомаркера (Marrugo-Ramírez et al., 2018), у оквиру овог рада биће описана три поменута типа биомаркера, уз додатак циркулишуће слободне РНК (рибонуклеинска киселина) (енгл. *cell-free RNA* – cfRNA), као и њихова тренутна примењивост у онколошкој дијагностици и научним истраживањима.

ЦИРКУЛИШУЋЕ ТУМОРСКЕ ЋЕЛИЈЕ

Циркулишуће туморске ћелије су ћелије које се спонтано одвајају од тумора и системом за циркулацију

доспевају до различитих ткива и органа, а затим интерагују са микрооколином. Састоје се из више субпопулација различитих фенотипских и функционалних карактеристика (Fernández-Lázaro et al., 2020). У поређењу са другим крвним елементима као што су леукоцити, заступљени су и до 10^9 пута мање, а појединачне ћелије могу бити различите величине и облика у зависности од стадијума и врсте тумора (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Од леукоцита се разликују по додатним површинским маркерима: епителијалном ћелијском адхезионом молекулу ЕpCAM и цитокератинима, или по одсуству CD45 маркера, типичног за леукоците (Fernández-Lázaro et al., 2020). CTC се у циркулацији детектују као целе, апоптотичне, ћелије или у кластерима (Fernández-Lázaro et al., 2020), а такође могу бити везане за тромбоците или фибробласте у крви, при чему су заштићене од оксидативног стреса и имунског система (Lone et al., 2022). Сматра се да CTC одвајањем од тумора и уласком у циркулацију могу да доведу до формирања метастаза у другим органима, у процесу епителијално-мезенхималне транзиције (енгл. *epithelial mesenchymal transition* – EMT) туморских ћелија. EMT представља реверзибилну фенотипску трансформацију која омогућава покретљивост, инвазивност, отпорност на апоптозу и повећану продукцију екстрацелуларних протеина (Fernández-Lázaro et al., 2020; Soda et al., 2022). Различите генетичке и епигенетичке промене у примарним туморима утичу на овај процес, а самим тим на способност ширења и метастазирања тумора. Стога, CTC дају информације о маркерима који су у вези са EMT, као и њему супротног процеса мезенхимално-епителијалне транзиције (енгл. *mesenchymal epithelial transition* – MET), који може бити разлог појаве резистенције на одређене терапије. Због свега поменутог, CTC могу мењати експресију одређених маркера у току свих поменутих процеса, што им управо и омогућава да избегавају ћелијску смрт и даље се шире (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Изолација CTC

Технике које се користе за изолацију и обогаћивање CTC из узорак течне биопсије заснивају се на њиховим специфичним физичким и биохемијским карактеристикама: величини, могућности деформације, густини, или одређеним маркерима на површини од којих је најчешћи поменути ЕpCAM (Soda et al., 2022).

Најчешћа метода за изолацију CTC се заснива на принципу раздвајања ћелија коришћењем обележених антитела у магнетном пољу. Две врсте антитела се користе за раздвајање: једни се везују за маркере на CTC, углавном ЕpCAM, а други везују маркер CD45 и на тај начин се уклањају ометајући и много заступљенији леукоцити. CellSearch® систем (<https://www.cellsearchctc.com/>) је систем који је одобрила Америчка управа за храну и лекове (енгл. *U.S. Food and Drug Administration* – FDA) за изолацију засновану на овом принципу, а за запремину пуне крви од 7,5 mL показује специфичност > 99 % и селективност од 97 % (Fernández-Lázaro et al., 2020). FDA је најпре одобрио CellSearch® систем за предикцију исхода болести код пацијената са метастатским карциномом

дојке 2004. године, а до 2008. године и за праћење пацијената са карциномом колоректума и панкреаса (Millner et al., 2013). Треба имати на уму да овај приступ не може да детектује ћелије које пролазе кроз EMT, када долази до губитка маркера (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Микрофлуидни уређаји добијају на популарности због једноставности производње и потребне мање количине реагенса. На имуноафинитетном принципу развијен је и први CTC чип (енгл. *CTC chip*) (Nagrath et al., 2007), ХБ чип (енгл. *HB chip - Herringbone chip*) (Stott et al., 2010), Ефезиа (енгл. *Ephesia*) CTC чип (Saliba et al., 2010) и други (Soda et al., 2022). Још једна метода изолације ћелија може се извести помоћу инструмента CellCollector® (Gilupi, <https://gilupi.com/>), који раздваја и хвата CTC *in vivo*, односно представља катетер обложен антителима EpCAM, који се ставља и задржава 30 минута у вени руке пацијента, што систем чини више инвазивним. Иако се овим превазилази ниска запремина крви, и даље је показао мању специфичност (90 % у студији са пацијентима оболелим од карцинома плућа) и селективност (52.94 %) од CellSearch® система. Поред CellSearch® и CellCollector®, на сличним принципима са извесним модификацијама, заснивају се и есеји MACS® (*Magnetic Activated Cell Sorting system*, Miltenyibiotec, <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/>) и AdnaTest® (Qiagen, <https://www.qiagen.com/us>). Комплети који изолују CTC на основу морфолошких карактеристика су ISET® (енгл. *Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*, Rarecells, <https://www.rarecells.com/iset-technology>), а на основу густине најпознатији је OncoQuick® (Greiner Bio-One, <https://www.gbo.com/en-int/company>) (Fernández-Lázaro et al., 2020). Иако су установљене потенцијалне примене CTC у свим стадијумима болести, потребно је унапредити поменуте методе изолације, квантификације и детекције да би се, поред CellSearch® система, нашле на листи одобрених за клиничку употребу (Fernández-Lázaro et al., 2020). Радна група за циркулишуће туморске ћелије Европског друштва за течну биопсију (<https://www.uke.de/english/departments-institutes/institutes/tumor-biology/european-liquid-biopsy-society-elbs/working-groups/index.html>) интензивно се бави стандардизацијом ових метода да би се омогућила њихова шира примена ван истраживачких лабораторија.

ЦИРКУЛИШУЋА СЛОБОДНА ДНК И ЦИРКУЛИШУЋА СЛОБОДНА РНК

Циркулишућа слободна ДНК (енгл. *cell-free DNA – cfDNA*) је дужине 150 – 200 базних парова (енгл. *base pairs – bp*) и дефинише се као део екстрацелуларне ДНК која није део субцелуларне и нема њој сличну молекуларну структуру. Пореклом је из апоптотичних или некротичних ћелија, а иако тачан механизам није утврђен, сматра се да је могуће да cfDNA отпуштају и здраве ћелије. Присутна је и код здравих особа, али је у знатно већој концентрацији присутна код оболелих од патолошких процеса као што су карциноми. Концентрација cfDNA код здравих особа у плазми износи око 30 ng/mL, односно у распону 0 до 100 ng/mL, док се код пацијената оболелих од карцинома бележи концентрација и до 1000 ng/mL (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Разлог томе је неефективно уклањање остатака ових ћелија из циркулације фагоцитима код патолошких стања, као што се иначе дешава код здравих особа (Soda et al., 2022). Фракција cfDNA која је отпуштена из туморских ћелија назива се циркулишућа туморска ДНК (енгл. *circulating tumor DNA – ctDNA*), а дефинисана је на основу тачкастих мутација, метилације и секвенци типичних за ћелије тумора. Може бити једноланчана или дволанчана ДНК, а дужина варира у зависности од порекла: да ли их отпуштају апоптотичне или некротичне ћелије, CTC, или пак потичу из екстрацелуларних везикула живих ћелија (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Поред поменуте ctDNA, из узорак течне биопсије могуће је анализирати и друге циркулишуће туморске нуклеинске киселине: циркулишућа туморска РНК, дуге некодирајуће РНК (енгл. *long noncoding RNA – lncRNA*), микро РНК (енгл. *microRNA – miRNA*), и друге (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Циркулишућа слободна РНК – (енгл. *cell-free RNA – cfRNA*) је мање заступљена од cfDNA, али може да се детектује у серуму пацијената. Поред некодирајућих РНК, још један важан део cfRNA је циркулишућа туморска РНК (енгл. *circulating tumor RNA – ctRNA*). CtRNA би могла да се користи у клиничкој пракси за детекцију одређених мутација, али важније информације може да пружи о релативним нивоима експресије одређених гена. Међутим, применљивост анализе ових биомаркера у течној биопсији је ограничена због ниске концентрације, нестабилности и лоше репродукцибилности мерења (Fernández-Lázaro et al., 2020).

lncRNA и miRNA су две врсте некодирајућих РНК, прве су дужине преко 200 нуклеотида, а друге су краће од 200 нуклеотида. Њихове улоге су везане за интеракцију са протеинима и нуклеинским киселинама, што утиче на генску експресију. lncRNA учествује у регулацији обраде информационе РНК (иРНК) и стабилности исте, а њена потенцијална улога као биомаркера у онкологији се последњих година интензивније испитује. miRNA је једноланчана, најчешће дуга 18–25 нуклеотида, и учествује у експресији скоро 30 % протеин-кодирајућих гена. Због промене у експресији могу наступити различити биолошки процеси као што су туморигенеза или прогресија болести. Откривене су неке од потенцијалних дијагностичких примена miRNA као биомаркера из крви који могу да помогну разликовање патолошких од здравих стања (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Изолација и детекција cfDNA

За изолацију cfDNA постоје различити приступи, а одлука о томе који је најбољи зависи од даље примене cfDNA, јер преаналитичка фаза може да има велики утицај на жељену детекцију и анализу. Када говоримо о детекцији cfDNA и промена унутар ње, два су принципа коришћених техника: засноване на PCR (енгл. *polymerase chain reaction*) методи или NGS (енгл. *next generation sequencing*) технологијама.

Бројне технологије развијене су на принципу једноставне и јефтине PCR методологије, а техника дигиталног PCR се показала као корисна за детекцију мутација. Уз помоћ система микрофлуидног чипа и

дисперзије капи узорака, истовремено се врши вишеструка амплификација фрагмената ДНК, а најпознатији су BEAMing и ddPCR (енгл. *droplet digital PCR*) (Soda et al., 2022). Иако је BEAMing показао моћ детекције једног мутираног фрагмента према 10000 немутираних, сматра се непрактичним за рутинску клиничку употребу (Li et al., 2006). Због своје високе специфичности и селективности, оптималном технологијом за детекцију специфичних мутација заснованој на PCR реакцијама сматра се ddPCR, чак и за рану детекцију болести, када је концентрација cfDNA веома ниска (Junca et al., 2020).

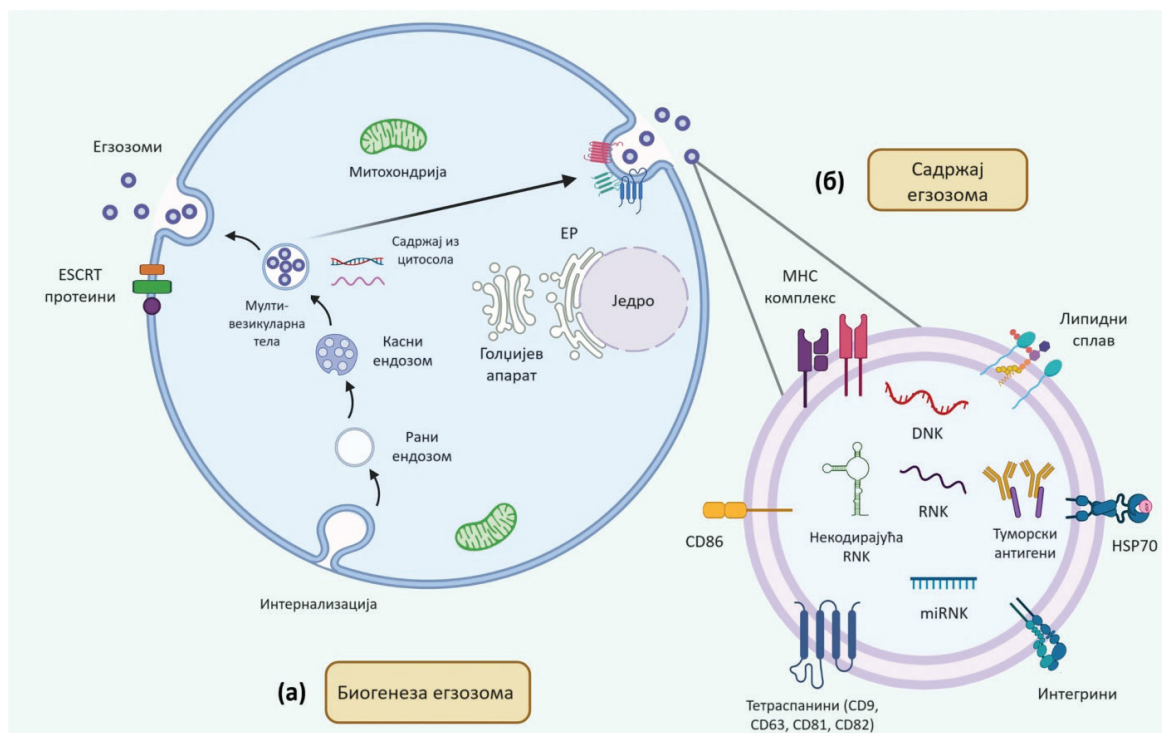
Са друге стране, NGS технологије служе за паралелну анализу милиона кратких секвенци које се пореде са неком постојећом, а могу и да се склапају *de novo*, без ослањања на референтни геном. Постоји неколико метода које се користе за анализирање специфичних секвенци: енгл. *tagged-amplicon deep sequencing* (TAm-seq), *safe-sequencing system* (Safe-SeqS) и *Cancer personalized profiling by deep sequencing* (CAPPSeq), а једна од најчешће коришћених је Ion-AmpliSeq (Soda et al., 2022). Поред поменутих техника, користе се и други приступи који подразумевају нетаргетовано секвенцирање целог генома или егзома за добијање информација о броју CNA или неспецифичних тачкастих мутација, у циљу детекције промена које се дешавају у току или након терапије (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Методe нетаргетованог секвенцирања још могу да се односе и на испитивање профила метилације специ-

фичног региона или целог генома ДНК. Методе користе конверзију бисулфитом и повећање метилације ctDNA, након чега следе амплификације фрагмената неком од техника заснованих на PCR: PCR специфичан за метилацију (енгл. *methylation specific PCR* – MSP), квантитативни мултиплексни PCR специфичан за метилацију (енгл. *quantitative multiplexed methylation-specific PCR* – QM-PCR) и модификовани PCR – метилација на куглицама (енгл. *methylation on beads* – MOB) (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНЕ ВЕЗИКУЛЕ – ЕГЗОЗОМИ

Егзозоме се дефинишу као мале везикуле обавијене мембраном које ћелије отпуштају као средство комуникације, односно транспорта важних протеина и нуклеинских киселина (Marrugo-Ramírez et al., 2018). Скоро сви типови ћелија отпуштају егзозоме, као подврсту екстрацелуларних везикула, у ванћелијски простор (Soda et al., 2022), а туморске ћелије у много већој мери. Овако настали егзозоме се могу детектовати у различитим телесним течностима (Fernández-Lázaro et al., 2020). Инвагинацијом ћелијске мембране долази до стварања примарних ендозомалних везикула, у оквиру којих се формирају егзозоме, а затим се ослобађају у ванћелијски простор (Слика 2) (Marrugo-Ramírez et al., 2018; Fernández-Lázaro et al., 2020; Soda et al., 2022). Пречника



Слика 2. Биогенеза и састав екстрацелуларних везикула.

а) Приказана је синтеза EV која започиње инвагинацијом ћелијске мембране, као и транспорт који је зависан или независан од ендозомалног сортирајућег комплекса потребног за транспорт (енгл. *endosomal sorting complex required for transport* – ESCRT). Рани ендозоме преузимају садржај из цитоплазме – РНК, ДНК и протеине. Затим се мултивезикуларна тела са својим разноврсним ћелијским садржајем спајају са ћелијском мембраном у циљу ослобађања EV. Одређени антигени се додају на EV у процесу ослобађања из ћелије. б) На шеми је приказан и састав EV. За приказане маркере на површини или у унутрашњости везикула се испитује применљивост у карактеризацији тумора. (Модификовано према Lone et al., 2022)

су од 40 – 150 nm, а садрже цитоскелетне, трансмембранске и протеине топлотног шока, липиде, ензиме као што су GAPDH, PGK1, АТФ-аза, и нуклеинске киселине: иРНК, miRNA и ДНК.

Егзозоми учествују у интрацелуларним сигналним путевима, утичући на експресију гена и фенотип ћелија до којих пристижу. Прва улога егзозома је откривена 1996. године, а утврђено је да секретовани од стране Б лимфоцита, егзозоми доводе до специфичне активације CD4+ Т лимфоцита (Raposo et al., 1996). Садржај егзозома зависи од ћелија ткива из којих су секретовани, што значи да уколико их секретују туморске ћелије, указују на стање и природу тумора (Fernández-Lázaro et al., 2020), због чега би могли имати улогу у дијагностици и праћењу болести. Ова област је тренутно изузетно актуелна и нова сазнања се свакодневно могу наћи у научној литератури.

Изолација EV

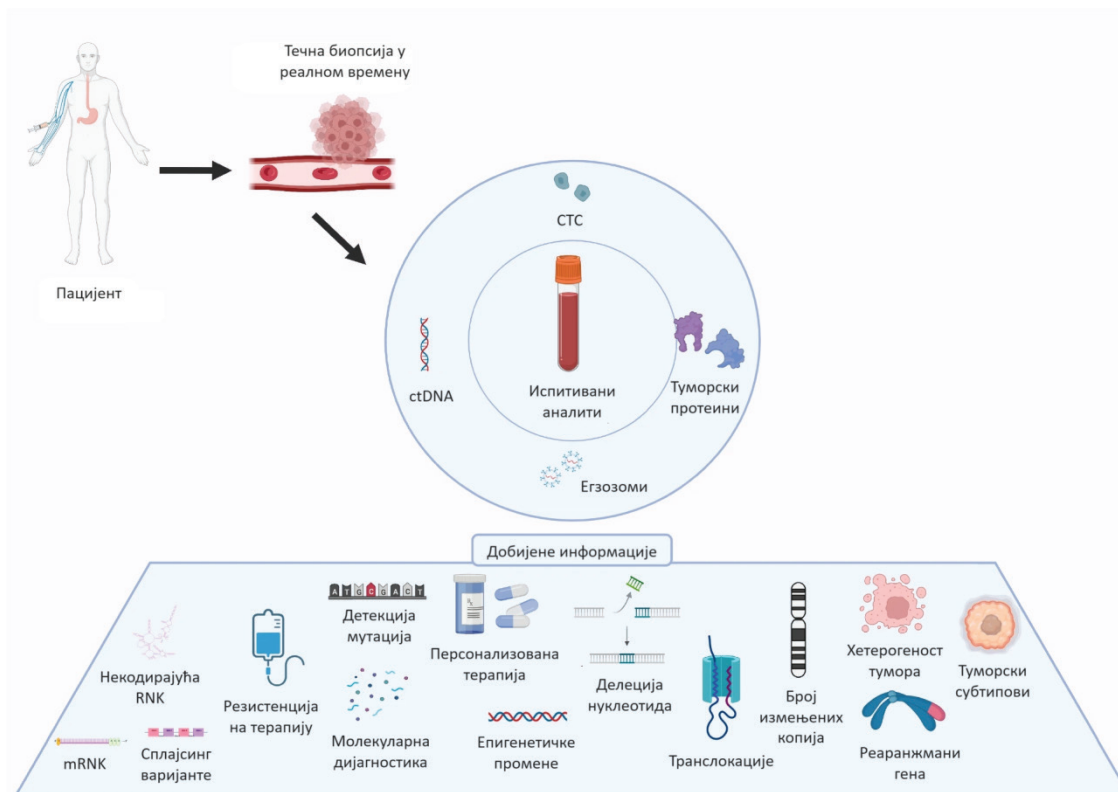
Постоји више техника изолација екстрацелуларних везикула које се заснивају на њиховим физичким карактеристикама, од којих је ултрацентрифугирање најпознатија и најчешће коришћена, потом ултрафилтрација и хроматографске методе (Lone et al., 2022). Друге врсте метода користе одређене имуноафинитетне интеракције за изолацију егзозома у односу на експресионе маркере на њиховим површинама. Пример методе су ELISA тестови, а један такав есеј са микроплејтом за изолацију и квантификацију егзозома из урина, плазме или серума, развили су Заровни (Zarovni) и сарадници (Zarovni et al., 2015). Ове методе, иако доста специфич-

не и ефикасне, релативно су скупе и потребна су њихова унапређења (Soda et al., 2022). Пример развијене методе је ExoChip, који су развили Канвар (Kanwar) и сарадници, а у питању је микрофлуидни уређај прављен на полидиметилсилоксану (PDMS) са антителима против CD63 (Kanwar et al., 2014).

Постоји још неколико приступа изолације егзозома заснованих на различитим принципима: гел-филтрациона хроматографија – комплети произвођача iZON (<https://www.izon.com/>), и 101Bio (<https://www.101bio.com/>); преципитација: ExoQuick PLUS (System Biosciences, <https://www.systembio.com/>); ултрафилтрација ExoMir™ (Bioo Scientific, <http://www.biooscientific.com>) и други. Упркос свом великом потенцијалу у дијагностици и праћењу развоја малигних болести, примена EV у клиничке сврхе је ограничена због тешкоћа у ефикасности изолације и добијању недовољно високих приноса неоштећених EV, неопходних за дијагностику (Lone et al., 2022).

ПРИМЕНА У ДИЈАГНОСТИЦИ И НАУЧНИМ ИСТРАЖИВАЊИМА

Течна биопсија је нашла своје место у клиничкој пракси, али је и даље више заступљена у научним истраживањима. На Слици 3. су приказани најчешћи аналити који се испитују из узорак течне биопсије, као и њихова примена, док ће у даљем тексту бити описани резултати најважнијих истраживања о применљивости четири описана биомаркера у будућој клиничкој пракси, као и већ успостављеним применама у клиничкој онкологији.



Слика 3. Испитивани аналити течне биопсије и њихова примена у дијагностици, праћењу и лечењу карцинома (Модификовано према Lone et al., 2022)

СТС су у бројним студијама показале свој потенцијал да се користе у праћењу одговора на терапију и прогнозу при раној дијагнози болести. Након изолације могућа је генетичка анализа нуклеинских киселина чак и појединачних ћелија, а као алат за предикцију могао би се користити и број детектованих ћелија (Soda et al., 2022). Методе изоловања, детекције и квантификације се стално унапређују да би се ови биомаркери могли користити у клиничком окружењу за дијагностиковање и праћење различитих врста тумора. ctDNA из течне биопсије се испитује у сврху дијагностиковања, прогнозирања и асистенције при лечењу канцера, и то у реалном времену, због могућности генотипизације којом се стиче слика целокупног тумора (Fernández-Lázaro et al., 2020). Због својих структурних карактеристика и заступљености разних маркера, егзозоми су у студијама показали потенцијал за примену у дијагностици и праћењу одговора на терапију у будућности (Lone et al., 2022; Soda et al., 2022).

Рана детекција болести

Рана детекција малигних болести повећава успешност лечења и даје бољи исход, јер терапија у ранијим стадијумима умногоме повећава шансу за дугорочну ремисију. Од поменутих циркулишућих биомаркера, врло често се детектују и анализирају cfDNA, екстрацелуларне везикуле и метилација ДНК (Nikanjam et al., 2022).

CancerSEEK есеј је један од примера успешне примене анализе cfDNA, односно детекције генетичких варијација као потенцијалних биомаркера ране болести. Овај есеј је био коришћен за детекцију неметастатског рака јажника, јетре, желуца, панкреаса или једњака анализом cfDNA, сензитивност је износила од 69 до 98 %, а специфичност преко 99 %. CancerSEEK истовремено испитује генетичке варијације и 8 протеинских маркера, те на тај начин детектује присуство и локацију тумора у раним стадијумима (Cohen i sar. 2018). Такође је показано да стопа фрагментације cfDNA може бити индикатор присуства болести у комбинацији са другим маркерима, што је доказано у студијама о карциному плућа (Cristiano et al., 2019; Mathios et al., 2021).

Што се тиче других циркулишућих нуклеинских киселина, развијен је miR-Test за скрининг значајних циркулишућих miRNA из узорак течне биопсије које указују на постојање карцинома плућа код високо ризичних особа. Детекција се показала бољом него у случају употребе само нискодозног СТ (енгл. *computed tomography*) скенера који је метода избора за скрининг карцинома плућа (Montani et al., 2015). Дизајнирани су и тестови за изоловање и испитивање егзозома који садрже специфичне маркере, ради лакше употребе ових биомаркера у детекцији карцинома: ExoScreen препознаје маркере канцера колоректума, ExoTest служи за детекцију калвеолина-1 и CD63 код меланома, као и ExoQuick® (System Biosciences, <https://www.systembio.com/>) за изолацију miRNA, које би се користили као маркери карцинома панкреаса (Yoshioka et al., 2014; Jia et al., 2017; Junqueira-Neto et al., 2019). Поред тога, Хинестроса (Hinestrosa) и сарадници су испитивали маркере изолованих екстра-

целуларних везикула у циљу ране детекције карцинома панкреаса, јајника и бешике, а стопе детекције за први стадијум износиле су респективно 95 %, 74 % и 44 % (Hinestrosa et al., 2022).

Лиу (Liu) и сарадници су дошли до закључка да је за циљано испитивање метилације cfDNA у случају узнапредовалог колоректалног карцинома, неситноћелијског карцинома плућа, меланома и карцинома дојке, тачност резултата забележена у 83,8 %, специфичност је била 100 %, а у 78,9 % случајева је одређен тип болести (Liu et al., 2018). Значај у детекцији карцинома има и повећана метилација у тумор-супресорским генима. Један од примера одобрених тестова за рану детекцију карцинома је скрининг тест за колоректални карцином, при чему се детектује абнормална стопа метилације *SEPTIN9* гена из крви (Lamb & Dhillon, 2017). Такође је развијен дијагностички маркер специфичне метилације у хепатоцелуларном карциному, а панел је показао већу осетљивост и специфичност од маркера алфа фетопротеина (Xu et al., 2017).

Дијагноза и прогноза болести

Прецизна дијагноза болести последично доводи до примене бољег плана лечења, као и процене узнапредовалости и ризика поновног појављивања болести који дефинишу адекватну прогнозу.

Анализом укупне cfDNA трага се за ctDNA која може дати информације корисне за прецизније постављање дијагнозе болести. Генетички и епигенетички профил ctDNA из крви значајно се подудара са оним из ткива из којег потиче, па је могуће користити течну биопсију као алтернативно дијагностичко средство када није доступан узорак ткивне биопсије (Martins et al., 2021). Генотипизација биомаркера би се такође, могла користити за дијагностику, до чега би се дошло на основу резултата анализа и испитивања протеина и нуклеинских киселина из EV. Бројни примери су откривени анализирањем и испитивањем протеина и нуклеинских киселина из EV. Тако повећана експресија глипикана-1, заједно са мутацијом у гену *KRAS* би могла имати улогу у дијагностици тумора панкреаса (Melo et al., 2022), док присуство EV богатих миграционим инхибиторним фактором потенцијално указује на метастазе на јетри (Costa-Silva et al., 2015). Подједнако се могу испитивати и одређене miRNA: повећана експресија miR-1246, miR-4644, miR-3976 и miR-4306 у EV добри су биомаркери за дијагностику карцинома панкреаса (Madhavan et al., 2015), а miR-23b-3p, miR-10b-5p и miR-21-5p би исто тако могли бити значајни биомаркери за неситноћелијски карцином плућа (енгл. *non-small cell lung cancer* – NSCLC) (Q. Liu et al., 2017).

Иначе, сматра се да ниво ctDNA није довољан прогностички маркер. Са друге стране, број СТС пре неoadјувантне терапије или у време хируршког захвата директно корелише са прогнозом болести, што потврђује да СТС осликавају капацитет тумора да се шири. На пример, у студијама о карциному дојке је показано да се одређивањем броја СТС може препознати група пацијената која има висок ризик да дође до релапса болести. Ове и друге бројне студије су доказале и да су прогно-

тички потенцијал CTC и одговор на терапију независни, односно да одвојене CTC не морају да реагују исто као и ћелије примарног тумора. Да би се боље проценила поузданост ових маркера за прогнозирање неопходне су додатне студије (Alix-Panabières & Pantel, 2021).

Детекција релапса болести

Садашња пракса праћења релапса болести након операције ослања се на клиничке и патолошке факторе. С обзиром на то да не постоји поуздана метода за детекцију минималне резидуалне болести (МРД) и релапса, тренутна препорука је да већина пацијената прима неки вид адјувантне терапије, од које ће релативно мали број пацијената имати бенефит. Развој нових биомаркера за детекцију МРД после хируршке интервенције или радиотерапије значајно би допринео идентификацији група пацијената са већим и мањим ризиком од појаве релапса, где би се група пацијената са повишеним ризиком подвргла даљем терапијском третману или учесталијим контролама, док би пацијенти са малим ризиком за релапс били потенцијално поштеђени непотребног третмана, уз адекватно клиничко праћење (Beaver et al., 2014).

Обећава чињеница да су одређена испитивања показала да би CTC и ctDNA могли бити коришћени за детекцију релапса пре појаве клиничких симптома и потврде добијене тзв. имиџинг методама медицинске дијагностике. У више студија показано је да детекција cfDNA након радиотерапије или хируршког уклањања тумора може да укаже на микрометастазе и висок ризик од релапса, што би помогло у одабиру пацијената код којих би било пожељно увести и адјувантну терапију (Marrugo-Ramírez et al., 2018).

Једна студија је показала да појава CTC 2 до 5 година након примања терапије за карцином дојке корелише са високим ризиком релапса болести. Осим тога, вишеструко периодично анализирање узорака, при чему се пореди количина овог маркера, такође би могла указати на агресивност тумора, односно присуство минималне резидуалне болести (Chaudhuri et al., 2017; Haselmann et al., 2018).

Истраживања су показала да се и iPHK може испитивати у сврхе детекције резидуалне болести, односно да нивои одређене iPHK указују на резидуални тумор код плућних неуроендокриних тумора (Malczewska et al., 2019), односно miRNA у узорцима оболелих од хепатоцелуларног карцинома (Okajima et al., 2016) и карцинома плућа (Sestini et al., 2015).

Поменути подаци указују на то да је течна биопсија корисна у праћењу резидуалне болести, а различитим анализама циркулишућих биомаркера као додатних средстава уз постојеће технике за праћење тумора повећава се шанса за рану детекцију релапса.

Избор циљане терапије и детекција механизма резистенције

Течна биопсија има велику предност због једноставности чешћег и прецизнијег праћења разних догађаја који се дешавају у току терапије. У наредном тексту биће описана важна открића, као и већ успостављене

клиничке праксе анализе течне биопсије у сврху одлучивања о избору терапије, предвиђању или праћењу одговора на њу, као и детекције механизма резистенције који се појављују.

Избор терапије

Иако је актуелна клиничка примена бројања и анализе CTC ограничена, потенцијал за њихову примену је велики због мноштва информација које пружају и различитог порекла, односно субпопулација CTC. Доказана је клиничка употребљивост броја CTC као податка који помаже у избору између хемотерапије и хормонске терапије у случају метастатског карцинома дојке позитивног на хормонски рецептор (HR, енгл. *hormone receptor*) и негативног на HER2 (енгл. *receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*) (Bidard et al., 2021). Додатно, код карцинома простате, пацијенти код којих се детектује резистенција на хормонску терапију, односно формира тзв. тумор простате резистентан на кастрацију, уводе се лекови нове генерације, чије су мете андрогени рецептори. Међутим, може доћи до резистенције и на ове лекове, што се може детектовати одређивањем ARv7 сплајсоване варијанте имуноцитохемијским одређивањем експресије у нуклеусу CTC ћелија (Scher et al., 2017). Промене у ARv7 указују на потенцијалну резистенцију на блокаторе андрогених рецептора ензалутамида или абиратерона, односно установљено је да је бољи одговор на терапију цитостатиком таксаном (Antonarakis et al., 2015). У случају карцинома панкреаса, анализа CTC би могла служити приликом избора пацијената који би примали циљану анти-PSMA (енгл. *prostate-specific membrane antigen*) терапију, односно праћење одговора на њу. PSMA је један је од маркера канцера простате због његове високе експресије у малигним ћелијама, међутим, сматра се да одређени број метастатских ћелија карцинома не експримира овај маркер, због чега долази до резистенције (Nikanjam et al., 2022).

Детекција механизма резистенције на терапију

Једна од најзначајнијих примена течне биопсије је у праћењу прогресије болести и одговора на терапију. Редовном анализом и праћењем у реалном времену, разјашњавају се механизми стварања резистенције, а анализом ctDNA се откривају мутације у генима који доводе до резистенције на терапију (Soda et al., 2022). Мутације у *ESR1* гену указују на резистенцију ER (енгл. *estrogen receptor*) позитивног карцинома дојке на ендокрину терапију. Откривањем резистенције на време може се брже донети одлука о благовременој промени терапије и спречавању ширења тумора. На пример, пацијенту може бити преписана терапија инхибиторима CDK4/6, чија резистенција се детектује појавом мутација у *PI3K* гену (O'Leary et al., 2018). Даље, присуство мутација *KRAS* се истражује код пацијената оболелих од колоректалног карцинома, што је узрок резистенције на EGFR инхибиторе (Bettegowda et al., 2014). Још један пример је детекција мутација у гену *EGFR*, које указују на резистенцију на терапију тирозин-киназним инхибиторима код пацијената оболелих од NSCLC. Детектоване су и ретке мутације у *ROS1* или транслокације у *ALK* генима, које такође омогућавају увођење персонализоване терапије

код оболелих од те болести (Berger et al., 2018). Даље, резистенција на трастузумаб код HER2 позитивног метастатског канцера желуца, детектује се на основу промена у *ERBB2* гену (Wang et al., 2019). Квантитативна анализа мутације *BRAF*^{V600} у плазми, користи се као средство за праћење тока терапије, предикцију одговора и детекцију резистенције, приликом лечења пацијената оболелих од меланома BRAF/MEK инхибиторима (Ascierto et al., 2013; Santiago-Walker et al., 2016).

Праћење и предвиђање одговора на терапију

Познато је да се у току терапије одвија еволуција тумора, а управо је течна биопсија алат којим би се потенцијално пратиле промене услед терапије, или чак предвиђало на који начин ће пацијент одговорити на њу.

У циљу предикције одговора на хормонску терапију код пацијената са ER позитивним метастатским карциномом дојке, Паолети (Paoletti) и сарадници су развили вишепараметарски *CTC-Endocrine Therapy Index* (CTC-ETI) који користи CellSearch® систем, а поред бројања користи и детекцију четири маркера на CTC: ER, BCL2, HER2 и Ki-67 (Paoletti et al., 2015). Анализом података овим алатом долази се до закључака који показују постојање ER-негативних CTC у циркулацији, поред дијагностификованог примарног ER-позитивног карцинома дојке, чиме се сматра да је то механизам метастазирања, односно разлог неуспешности хормонске терапије (Babayian et al., 2013). У току су испитивања клиничке употребљивости овог алата.

У случају анализе miRNA код одређивања ефикасности терапије, смањена експресија miR-125b-5p се повезује са бољим одговором на имунотерапију (Peng et al., 2020), док се код NSCLC повећан ниво miR-146a-5p повезује са бољом осетљивошћу тумора на хемиотерапију (Yuwen et al., 2017), а повећана експресија miR-211-5p код меланома се повезује са резистенцијом на BRAF инхибиторе коришћене у лечењу метастатског меланома (Lunavat et al., 2017).

Имунотерапијски приступи се базирају на активацији имунског система, циљањем инхибитора контролних тачака (енгл. *Immune checkpoint inhibitors* - ICI). ctDNA и CTC су испитиване као средство праћења одговора на ову врсту терапије. Неке од студија су спровели Риђути (Ricciuti) и сарадници, испитивањем промене нивоа ctDNA код оболелих од NSCLC, у покушају да предвиде одговор на терапију. Мерени су нивои ctDNA на почетку и на контролом прегледу, код пацијената који су примали пембролизумаб са или без хемиотерапије базиране на платини/пеметрекседу. Резултати студија су показали да је пад нивоа ctDNA указивао на много бољи одговор на терапију, дужи период без прогресије и дуже преживљавање, наспрот пацијентима код којих је забележен пораст овог биомаркера (Ricciuti et al., 2021). Слични резултати су добијени испитивањем везе између нивоа ctDNA и одговором на терапију антителима против PD-1 (енгл. *programmed cell death protein 1*), код пацијената оболелих од метастатског меланома (Lee et al., 2018). Такође, Занг (Zang) и сарадници су одређивали фреквенцију варијанте алела код пацијената, пре и у

току терапије дурвалумабом са или без тремелидумаба. Виши ниво је корелисао са лошијим опоравком и нижом стопом преживљавања, док је пад истих након терапије указивао на супротно (Zhang et al., 2020). Ове и још неке студије говоре о корисности динамичког праћења cfDNA/ctDNA да се предвиди одговор на терапију уз дијагностичке имуноинженерске методе.

Одређеним анализама cfDNA такође би било могуће предвидети одговор на имунотерапију. NGS методама су мерене TMB (енгл. *tumor mutational burden*) из узорака ткива тумора и MSI-H (енгл. *microsatellite instability high*), а то је вршено и испитивањем ctDNA из крви (Nikanjam et al., 2022). Гандера (Gandera) и сарадници су установили да се TMB поклапа у ткивима и ctDNA из крви код оболелих од NSCLC, као и да су анализом ctDNA могли да установе који пацијенти би били погодни за примање PD-L1 (енгл. *programmed death-ligand 1*) антитела (атезолизумаба) као секундарне терапије (Gandera et al., 2018).

УПОТРЕБА ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ У ОНКОЛОШКОЈ ПРАКСИ У СРБИЈИ

У претходном тексту описане су неке од најважнијих клиничких примена и резултата истраживања у вези употребе течне биопсије у онколошкој дијагностици и научним испитивањима у свету. У Србији, на Институту за онкологију и радиологију Србије (ИОРС), на одељењу за Експерименталну онкологију, течна биопсија је такође нашла примену у молекуларној дијагностици и научним истраживањима.

У сврху молекуларног профилисања тумора најчешће се користи узорак ткивне биопсије. У циљу персонализованог лечења пацијената, од 2008. године испитују се мутације у *RAS* генима у метастатском карциному дебелог црева, као и најчешће мутације у гену *EGFR* код пацијената оболелих од карцинома плућа и мутације у *BRAF* гену у метастатском меланому. Такође, из узорака крви су анализирани полиморфизми неких гена који кодирају одређене ензиме, што је коришћено за предикцију токсичности одређених лекова: ензима CYP2D6 за предострожност увођењу тамоксифена у терапију против карцинома дојке, односно дихидропиридин-дехидрогеназе пре терапије 5-флуороурацилом, као и метилентетрахидрофолат редуктазе у лечењу метотрекатом (Cavic et al., 2016).

Течна биопсија је први пут уведена 2016. године за детекцију мутација у гену *EGFR* из крви код пацијената оболелих од карцинома плућа (Cavic et al., 2021). Такође, на ИОРС се користи и плеурални излив (ПИ) као узорак течне биопсије. ПИ представља компликацију код пацијената са карциномом плућа и јавља се код 7 до 23 % пацијената (Froudarakis, 2012). Обично се пунктира ради уклањања симптома отежаног дисања. У већем броју научних истраживања је показано да је ПИ богат извор циркулишућих нуклеинских киселина, па је због тога и генетичко тестирање на присуство резистентне *EGFR* T790M мутације из cfDNA пореклом из ПИ пацијената уведено као рутинско тестирање само на ИОРС. Показано је да анализе из ПИ имају готово подједнаку, а у неким случајевима и бољу сензитивност детекције те

мутације у односу на тестирање из узорак крви (Табела 1) (Vukovic et al., 2023). Од 2018. године се на ИОПС из течне биопсије (узорак крви) врши NGS генетичко тестирање на присуство наследног неполипозног колоректалног карцинома, познатијег као Линчов синдром, код особа оболелих од колоректалног карцинома или карцинома ендометријума у раном животном добу и/или особа са богатом породичном историјом карцинома из Линчовог синдрома (Cavic et al., 2024).

Табела 1. Детекција *EGFR* T790M мутације у упареним узорцима течне биопсије пацијената код којих је установљена клиничка резистенција на *EGFR* тирозин-киназне инхибиторе (крв и плеурални излив). (Презето из Vukovic et al., 2023, модификовано).

Крв	Плеурални излив	
	<i>EGFR</i> T790M позитивни	<i>EGFR</i> T790M негативни
<i>EGFR</i> T790M позитивни	4	0
<i>EGFR</i> T790M негативни	6	10

Значај здравствено-економских анализа

Иако постоји потенцијал примене и других дијагностичких тестова из течне биопсије, процес укључивања нове технологије или терапије у свакодневну клиничку праксу је често дуг и компликован. Иза сваке интеграције нове врсте терапије или технологије, а након њеног пуштања на тржиште, стоје економски и финансијски аспекти који омогућавају правдање њене корисности, добити друштва и одрживости у клиничком окружењу. Због ограничености средстава за финансирање иновативних технологија или терапија у здравственом систему, постоје методе помоћу којих се изводе процене вредности, односно клиничке ефикасности и исплативости датих технологија у циљу одабира оне која ће бити финансирана. За сваку тзв. процену здравствене технологије – терапију, дијагностичку процедуру и слично, потребно је прикупити информације из адекватно дизајнираних и спроведених студија које су у вези са тим технологијама. Након тога, потребна је адекватна анализа прикупљених информација (енгл. *Health Technology Assessment - HTA*), а затим и њихово стављање у национални контекст, да би се добиле што реалније, тачније и транспарентније процене применљивости у свакој земљи. Стручњаци који учествују у проценама здравствених технологија, на основу тога саветују доносиоце одлука да нове технологије учине доступним што већем броју пацијената, уз најмању штету по друге процесе и националне потребе у здравственом систему. Државе које имају државно здравствено осигурање ослањају се на државне органе који праве ове здравствено-економске процене на основу којих се даје препорука о томе које интервенције могу да буду усвојене у наредном периоду (Pearson & Rawlins, 2005; Grusenmeyer & Wong, 2007). Важно је напоменути да постоје различити приступи проценама здравствених технологија, који

различито дефинишу вредност и да се процене врше, а одлуке доносе, у зависности од опредељења здравственог система државе или неког другог доносиоца одлуке (<https://www.janssenwithme.rs/lt-sr-sp/advocacy-center/vazne-informacije/zdravstvena-ekonomija/pristupi-proceni-zdravstvenih-tehnologija-hta>). У Србији, за увођење нове здравствене технологије, здравствена установа или произвођач упућују захтев уз који се прилаже документација, административна и здравствено-економска, коју између осталог чине поменути подаци о делотворности из клиничких студија и економска анализа примене нове технологије. Процену здравствене технологије и давање мишљења о процени врши Завод за јавно здравље, а министар здравља на основу процене одлучује да ли ће захтев за увођење нове здравствене технологије бити прихваћен или одбијен (<https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/350554/pravilnik-o-blizim-uslovima-i-nacinu-vrsenja-procena-zdravstvenih-tehnologija.php>).

ПРЕДНОСТИ И МАНЕ ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ

Поред потенцијалних и већ успостављених примена течне биопсије у онкологији, постоји велики број недостатака који отежавају употребу течне биопсије у клиничкој пракси. Низак број СТС отежава детекцију, а ниска концентрација и честа фрагментација cfDNA отежава изолацију и анализу. Због немогућности директне анализе, потребна су додатна пречишћавања или амплификације које захтевају више времена. Проблем такође представља и хетерогеност узорак, као и несигурност да су ћелије свих хетерогених делова тумора обухваћене (Siravegna et al., 2017). Додатни изазови техничке природе су одабир и припрема узорка, а с тим у вези и поређење резултата добијених различитим методама квантификације (Soda et al., 2022). Сви ови недостаци праћени су и тренутно високом ценом већине постојећих метода, што отежава примену у свакодневној онколошкој пракси, нарочито у земљама са ограниченим финансијским ресурсима.

Ипак, течна биопсија је минимално инвазивна, једноставна и релативно поуздана за детекцију и праћење болести, а информације које се добијају анализом циркулишућих биомаркера су бројне (Soda et al., 2022). У даљем развоју метода које би пронашле примену у клиничкој онкологији, потребно је обратити пажњу на стандардизацију преаналитичких и аналитичких метода и протокола, а потом и на начине интерпретирања резултата (Hodson, 2016).

ЗАКЉУЧАК

Течна биопсија је моћно средство које омогућава анализирање различитих елемената туморског порекла из крви и других телесних течности, а даје бројне и комплементарне информације о примарном тумору и метастазама. Могућност ажурирања података о тумору сваком следећом течном биопсијом на релативно лагодан начин, олакшава детекцију и праћење еволуције целокупног тумора. Једноставност и минимална инвазивност течне биопсије у поређењу са биопсијом ткива,

такође је допринело интензивном испитивању могућих примена у клиничкој онкологији. Анализа cfDNA је пронашла примену у праћењу појаве резистенције на терапију, док употреба EV за сада остаје предмет научних истраживања. За имплементацију течне биопсије у рутинску клиничку праксу, потребна је оптимизација и стандардизација у свим деловима процеса анализирања биомаркера, као и даље испитивање клиничке валидности и корисности у великим клиничким студијама. О потенцијалу за њихову широку примену сведоче позитивни резултати бројних истраживања, који указују на то ће течна биопсија имати своје шире рутинско место у клиничкој онкологији у веома блиској будућности.

ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад је проистекао из истраживања у оквиру пројеката STEPUP1ORS, Horizon Europe Framework Programme (HORIZON-WIDERA-2021-ACCESS-03, STEPUP1ORS - 101079217) и EXPAND-EV, Horizon Europe Framework Programme (HORIZON-MSCA-2023-SE-01, EXPAND-EV - 101182851) уз подршку Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (бр. уговора 451-03-136/2025-03/ 200043).

Abstract

LIQUID BIOPSY APPLICATION IN CANCER DIAGNOSTICS AND SCIENTIFIC RESEARCH

Teodora ĆATO, Miodrag VUKOVIĆ, Milena ČAVIĆ, Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade

In recent years, liquid biopsy has been studied as an alternative to invasive tissue biopsy, while its use in complementary analysis of tumor is slowly finding its way into the clinical workflow. A variety of biomarkers from different liquid biopsy samples, such as blood, urine, saliva, pleural effusion and cerebrospinal fluid, are extracted and analysed for their molecular characteristics. Some of those biomarkers include circulating tumor cells, circulating free nucleic acids and extracellular vesicles. Liquid biopsy enables obtaining information regarding tumor's origin, structure and evolution mechanisms, in a relatively easy, minimally invasive and low-cost manner. Modern methods for detection and analysis of liquid biopsy biomarkers enabled intensified research and their use in tumor monitoring throughout all stages of disease as well as treatment. Promising results highlight the future use in clinical oncology for early detection and disease relapse, diagnosis, prognosis, search for novel therapeutic targets and mechanisms of resistance to treatment. This review provided an overview of the most frequently analysed liquid biopsy biomarkers and the most important results regarding their global clinical application and in Serbia.

Keywords: biomarker, liquid biopsy, circulating free DNA, extracellular vesicles, circulating tumor cells

ЛИТЕРАТУРА

- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discovery*, 11 (4). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Luber, B., Wang, H. Y., Nakazawa, M., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A., Eisenberger, M. A., & Luo, J. (2015). Androgen receptor splice variant 7 and efficacy of taxane chemotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncology*, 1 (5). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1341>
- Ascierto, P. A., Minor, D., Ribas, A., Lebbe, C., O'Hagan, A., Arya, N., Guckert, M., Schadendorf, D., Kefford, R. F., Grob, J. J., Hamid, O., Amaravadi, R., Simeone, E., Wilhelm, T., Kim, K. B., Long, G. V., Martin, A. M., Mazumdar, J., Goodman, V. L., & Trefzer, U. (2013). Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 31 (26). <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.8691>
- Babayan, A., Hannemann, J., Spötter, J., Müller, V., Pantel, K., & Joosse, S. A. (2013). Heterogeneity of Estrogen Receptor Expression in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer Patients. *PLoS ONE*, 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075038>
- Beaver, J. A., Jelovac, D., Balukrishna, S., Cochran, R. L., Croessmann, S., Zabransky, D. J., Wong, H. Y., Toro, P. V., Cidado, J., Blair, B. G., Chu, D., Burns, T., Higgins, M. J., Stearns, V., Jacobs, L., Habibi, M., Lange, J., Hurley, P. J., Luring, J., ... Park, B. H. (2014). Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 20 (10). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2933>
- Berger, L. A., Janning, M., Velthaus, J. L., Ben-Batalla, I., Schatz, S., Falk, M., Iglauer, P., Simon, R., Cao, R., Forcato, C., Manaresi, N., Bramlett, K., Buson, G., Hanssen, A., Tiemann, M., Sauter, G., Bokemeyer, C., Riethdorf, S., Reck, M., ... Loges, S. (2018). Identification of a High-Level MET Amplification in CTCs and ctDNA of an ALK-Positive NSCLC Patient Developing Evasive Resistance to Crizotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, 13 (12). <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2025>
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*, 6 (224). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>
- Bidard, F. C., Jacot, W., Kiavue, N., Dureau, S., Kadi, A., Brain, E., Bachelot, T., Bourgeois, H., Gonçalves, A., Ladoire, S., Naman, H., Dalenc, F., Gligorov, J., Espié, M., Emile, G., Ferrero, J. M., Loirat, D., Frank, S., Cabel, L., ... Pierga, J. Y. (2021). Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 7 (1). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5660>
- Cavic, M., Krivokuca, A., Boljevic, I., Brotto, K., Jovanovic, K., Tanic, M., Filipovic, L., Zee, M., Malisic, E., Jankovic, R., & Radulovic, S. (2016). Pharmacogenetics in cancer therapy - 8 years of experience at the Institute for Oncol-

- ogy and Radiology of Serbia. *Journal of B.U.ON.*, 21 (5).
- Cavic, M., Krivokuca, A., Pavlovic, M., Boljevic, I., Rakobradovic, J., Mihajlovic, M., Tanic, M., Damjanovic, A., Malisic, E., & Jankovic, R. (2021). EGFR mutation testing from liquid biopsy of non-small cell lung cancer at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *Journal of B.U.ON.*, 25 (6).
- Cavic, M., Nikolic, N., Marinkovic, M., Damjanovic, A., Krivokuca, A., Tanic, M., ... & Spasic, J. (2024). Two Decades of Progress in Personalized Medicine of Colorectal Cancer in Serbia—Insights from the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *Biomedicines*, 12 (10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102278>
- Chaudhuri, A. A., Chabon, J. J., Lovejoy, A. F., Newman, A. M., Stehr, H., Azad, T. D., Khodadoust, M. S., Esfahani, M. S., Liu, C. L., Zhou, L., Scherer, F., Kurtz, D. M., Say, C., Carter, J. N., Merriott, D. J., Dudley, J. C., Binkley, M. S., Modlin, L., Padda, S. K., ... Diehn, M. (2017). Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discovery*, 7 (12). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0716>
- Cohen, J. D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A. A., Wong, F., Mattox, A., Hruban, R. H., Wolfgang, C. L., Goggins, M. G., Molin, M. D., Wang, T. L., Roden, R., Klein, A. P., Ptak, J., Dobbyn, L., ... Papadopoulos, N. (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, 359 (6378). <https://doi.org/10.1126/science.aar3247>
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., García-Santos, G., Williams, C., Araso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17 (6). <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Cristiano, S., Leal, A., Phallen, J., Fiksel, J., Adleff, V., Bruhm, D. C., Jensen, S. Ø., Medina, J. E., Hruban, C., White, J. R., Palsgrove, D. N., Niknafs, N., Anagnostou, V., Forde, P., Naidoo, J., Marrone, K., Brahmer, J., Woodward, B. D., Husain, H., ... Velculescu, V. E. (2019). Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*, 570 (7761). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6>
- Fernández-Lázaro, D., Hernández, J. L. G., García, A. C., Martínez, A. C., Mielgo-Ayuso, J., & Cruz-Hernández, J. J. (2020). Liquid biopsy as novel tool in precision medicine: Origins, properties, identification and clinical perspective of cancer's biomarkers. *Diagnostics*, 10 (4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040215>
- Froudarakis, M. E. (2012). Pleural effusion in lung cancer: More questions than answers. *Respiration*, 83 (5). <https://doi.org/10.1159/000338169>
- Gandara, D. R., Paul, S. M., Kowanetz, M., Schleifman, E., Zou, W., Li, Y., Rittmeyer, A., Fehrenbacher, L., Otto, G., Malboeuf, C., Lieber, D. S., Lipson, D., Silterra, J., Amler, L., Riehl, T., Cummings, C. A., Hegde, P. S., Sandler, A., Ballinger, M., ... Shames, D. S. (2018). Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nature Medicine*, 24 (9). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0134-3>
- Grusenmeyer, P. A., & Wong, Y. N. (2007). Interpreting the economic literature in oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (2). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0738>
- Haselmann, V., Gebhardt, C., Brechtel, I., Duda, A., Czerwinski, C., Sucker, A., Holland-Letz, T., Utikal, J., Schadendorf, D., & Neumaier, M. (2018). Liquid profiling of circulating tumor DNA in plasma of melanoma patients for companion diagnostics and monitoring of BRAF inhibitor therapy. *Clinical Chemistry*, 64 (5). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.281543>
- Hinestrosa, J. P., Kurzrock, R., Lewis, J. M., Schork, N. J., Schroeder, G., Kamat, A. M., Lowy, A. M., Eskander, R. N., Perra, O., Searson, D., Rastegar, K., Hughes, J. R., Ortiz, V., Clark, I., Balcer, H. I., Arakelyan, L., Turner, R., Billings, P. R., Adler, M. J., ... Krishnan, R. (2022). Early-stage multi-cancer detection using an extracellular vesicle protein-based blood test. *Communications Medicine*, 2 (1). <https://doi.org/10.1038/s43856-022-00088-6>
- Hodson, R. (2016). Precision medicine. *Nature*, 537, S49. <https://doi.org/10.1038/537S49a>
- <https://www.janssenwithme.rs/lt-sr-sp/advocacy-center/vazne-informacije/zdravstvena-ekonomija/pristupi-proceni-zdravstvenih-tehnologija-ha>
- <https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/350554/pravilnik-o-blizim-uslovima-i-nacinu-vrsenja-procene-zdravstvenih-tehnologija.php>
- Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B., Hu, W., Wang, L., Zhao, W., & Zhou, J. (2017). Exosome: Emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget*, 8 (25). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16684>
- Junca, A., Tachon, G., Evrard, C., Villalva, C., Frouin, E., Karayan-Tapon, L., & Tougeron, D. (2020). Detection of colorectal cancer and advanced adenoma by liquid biopsy (Decalib study): The ddPCR challenge. *Cancers*, 12 (6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061482>
- Junqueira-Neto, S., Batista, I. A., Costa, J. L., & Melo, S. A. (2019). Liquid Biopsy beyond Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA. *Acta Cytologica*, 63 (6). <https://doi.org/10.1159/000493969>
- Kanwar, S. S., Dunlay, C. J., Simeone, D. M., & Nagrath, S. (2014). Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab on a Chip*, 14 (11). <https://doi.org/10.1039/c4lc00136b>
- Lamb, Y. N., & Dhillon, S. (2017). Epi proColon® 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21 (2). <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0259-y>
- Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2006). BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, 3 (2). <https://doi.org/10.1038/nmeth850>
- Liu, L., Toung, J. M., Jassowicz, A. F., Vijayaraghavan, R., Kang, H., Zhang, R., Kruglyak, K. M., Huang, H. J., Hinoue, T., Shen, H., Salathia, N. S., Hong, D. S., Naing, A., Subbiah, V., Piha-Paul, S. A., Bibikova, M., Granger, G., Barnes, B., Shen, R., ... Janku, F. (2018). Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification. *Annals of Oncology*, 29 (6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy119>

- Liu, Q., Yu, Z., Yuan, S., Xie, W., Li, C., Hu, Z., Xiang, Y., Wu, N., Wu, L., Bai, L., & Li, Y. (2017). Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 8 (8). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14369>
- Lone, S. N., Nisar, S., Masoodi, T., Singh, M., Rizwan, A., Hashem, S., El-Rifai, W., Bedognetti, D., Batra, S. K., Haris, M., Bhat, A. A., & Macha, M. A. (2022). Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer*, 21 (1). <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7>
- Lunavat, T. R., Cheng, L., Einarsdottir, B. O., Bagge, R. O., Muralidharan, S. V., Sharples, R. A., Lässer, C., Gho, Y. S., Hill, A. F., Nilsson, J. A., & Lötvall, J. (2017). BRAFV600 inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 (29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1705206114>
- Madhavan, B., Yue, S., Galli, U., Rana, S., Gross, W., Müller, M., Giese, N. A., Kalthoff, H., Becker, T., Büchler, M. W., & Zöller, M. (2015). Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *International Journal of Cancer*, 136 (11). <https://doi.org/10.1002/ijc.29324>
- Malczewska, A., Oberg, K., Bodei, L., Aslanian, H., Lewczuk, A., Filosso, P. L., Wójcik-Giertuga, M., Rydel, M., Zielińska-Leś, I., Walter, A., Suarez, A. L., Kolasinśka-Cwikła, A., Roffinella, M., Jamidar, P., Ziora, D., Czyzewski, D., Kos-Kudła, B., & Cwikła, J. (2019). NETest Liquid Biopsy Is Diagnostic of Lung Neuroendocrine Tumors and Identifies Progressive Disease. *Neuroendocrinology*, 108 (3). <https://doi.org/10.1159/000497037>
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2017). European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28 (5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx033>
- Marrugo-Ramírez, J., Mir, M., & Samitier, J. (2018). Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: A promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102877>
- Martins, I., Ribeiro, I. P., Jorge, J., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Melo, J. B., & Carreira, I. M. (2021). Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes*, 12 (3). <https://doi.org/10.3390/genes12030349>
- Mathios, D., Johansen, J. S., Cristiano, S., Medina, J. E., Phallen, J., Larsen, K. R., Bruhm, D. C., Niknafs, N., Ferreira, L., Adleff, V., Chiao, J. Y., Leal, A., Noe, M., White, J. R., Arun, A. S., Hruban, C., Annapragada, A. V., Jensen, S. Ø., Ørntoft, M. B. W., ... Velculescu, V. E. (2021). Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes. *Nature Communications*, 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24994-w>
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnica-Worms, D., & Kalluri, R. (2022). Author Correction: Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer (*Nature*, (2015), 523, 7559, (177-182), 10.1038/nature14581). *Nature*, 610 (7932). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05062-9>
- Millner, L.M., Linder, M.W., Valdes, R. Jr. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. (2013) *Ann Clin Lab Sci*, Summer; 43 (3). PMID: 23884225; PMCID: PMC5060940.
- Montani, F., Marzi, M. J., Dezi, F., Dama, E., Carletti, R. M., Bonizzi, G., Bertolotti, R., Bellomi, M., Rampinelli, C., Maisonneuve, P., Spaggiari, L., Veronesi, G., Nicassio, F., Di Fiore, P. P., & Bianchi, F. (2015). MiR-test: A blood test for lung cancer early detection. *Journal of the National Cancer Institute*, 107 (6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv063>
- Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., & Toner, M. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450 (7173). <https://doi.org/10.1038/nature06385>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *Journal of Hematology and Oncology*, 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Okajima, W., Komatsu, S., Ichikawa, D., Miyamae, M., Kawaguchi, T., Hirajima, S., Ohashi, T., Imamura, T., Kiuchi, J., Arita, T., Konishi, H., Shiozaki, A., Morimura, R., Ikoma, H., Okamoto, K., Taniguchi, H., Itoh, Y., & Otsuji, E. (2016). Circulating microRNA profiles in plasma: Identification of miR-224 as a novel diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function. *Oncotarget*, 7 (33). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10781>
- O'Leary, B., Hrebien, S., Morden, J. P., Beaney, M., Fribbens, C., Huang, X., Liu, Y., Bartlett, C. H., Koehler, M., Cristofanilli, M., Garcia-Murillas, I., Bliss, J. M., & Turner, N. C. (2018). Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nature Communications*, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03215-x>
- Paoletti, C., Muñoz, M. C., Thomas, D. G., Griffith, K. A., Kidwell, K. M., Tokudome, N., Brown, M. E., Aung, K., Craig Miller, M., Blossom, D. L., Schott, A. F., Lynn Henry, N., Rae, J. M., Connelly, M. C., Chianese, D. A., & Hayes, D. F. (2015). Development of circulating tumor cell-endocrine therapy index in patients with hormone receptor-positive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21 (11). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1913>
- Pearson, S. D., & Rawlins, M. D. (2005). Quality, innovation, and value for money: NICE and the British National Health Service. *JAMA*, 294 (20). <https://doi.org/10.1001/jama.294.20.2618>

- Peng, X. X., Yu, R. Y., Wu, X., Wu, S. Y., Pi, C., Chen, Z. H., Zhang, X. C., Gao, C. Y., Shao, Y. W., Liu, L., Wu, Y. L., & Zhou, Q. (2020). Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild-type advanced non-small cell lung cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8 (1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000376>
- Qi, Z. H., Xu, H. X., Zhang, S. R., Xu, J. Z., Li, S., Gao, H. L., Jin, W., Wang, W. Q., Wu, C. T., Ni, Q. X., Yu, X. J., & Liu, L. (2018). The significance of liquid biopsy in pancreatic cancer. *Journal of Cancer*, 9 (18). <https://doi.org/10.7150/jca.24591>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. M., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183 (3). <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Ricciuti, B., Jones, G., Severgnini, M., Alessi, J. V., Recondo, G., Lawrence, M., Forshew, T., Lydon, C., Nishino, M., Cheng, M., & Awad, M. (2021). Early plasma circulating tumor DNA (ctDNA) changes predict response to first-line pembrolizumab-based therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9 (3). <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001504>
- Saliba, A. E., Saias, L., Psychari, E., Minc, N., Simon, D., Bidard, F. C., Mathiot, C., Pierga, J. Y., Fraissier, V., Salamero, J., Saada, V., Farace, F., Vielh, P., Malaquin, L., & Viovy, J. L. (2010). Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1001515107>
- Santiago-Walker, A., Gagnon, R., Mazumdar, J., Casey, M., Long, G. V., Schadendorf, D., Flaherty, K., Kefford, R., Hauschild, A., Hwu, P., Haney, P., O'Hagan, A., Carver, J., Goodman, V., Legos, J., & Martin, A. M. (2016). Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clinical Cancer Research*, 22 (3). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0321>
- Scher, H. I., Graf, R. P., Schreiber, N. A., McLaughlin, B., Lu, D., Louw, J., Danila, D. C., Dugan, L., Johnson, A., Heller, G., Fleisher, M., & Dittamore, R. (2017). Nuclear-specific AR-V7 Protein Localization is Necessary to Guide Treatment Selection in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 71 (6). <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.11.024>
- Sestini, S., Boeri, M., Marchiano, A., Pelosi, G., Galeone, C., Verri, C., Suatoni, P., Sverzellati, N., Vecchia, C. La, Sozzi, G., & Pastorino, U. (2015). Circulating microRNA signature as liquid-biopsy to monitor lung cancer in low-dose computed tomography screening. *Oncotarget*, 6 (32). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5210>
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (9). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
- Soda, N., Clack, K., & Shiddiky, M. J. A. (2022). Recent advances in liquid biopsy technologies for cancer biomarker detection. *Sensors and Diagnostics*, 1 (3). <https://doi.org/10.1039/d2sd00010e>
- Stott, S. L., Hsu, C. H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., Waltman, B. A., Michael Rothenberg, S., Shah, A. M., Smas, M. E., Korir, G. K., Floyd, F. P., Gilman, A. J., Lord, J. B., Winokur, D., Springer, S., Irimia, D., Nagrath, S., Sequist, L. V., Lee, R. J., ... Toner, M. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1012539107>
- Vukovic, M., Tanic, M., Damjanovic, A., Pavlovic, M., Stanojevic, A., Zivic, K., Karadzic, V., Jankovic, R., & Cavic, M. (2023). EGFR mutation testing from pleural effusions of non-small cell lung cancer patients at the institute for oncology and radiology of Serbia. *Translational Oncology*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101772>
- Wang, D. S., Liu, Z. X., Lu, Y. X., Bao, H., Wu, X., Zeng, Z. L., Liu, Z., Zhao, Q., He, C. Y., Lu, J. H., Wang, Z. Q., Qiu, M. Z., Wang, F., Wang, F. H., Li, Y. H., Wang, X. N., Xie, D., Jia, W. H., Shao, Y. W., & Xu, R. H. (2019). Liquid biopsies to track trastuzumab resistance in metastatic HER2-positive gastric cancer. *Gut*, 68 (7). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316522>
- Xu, R. H., Wei, W., Krawczyk, M., Wang, W., Luo, H., Flag, K., Yi, S., Shi, W., Quan, Q., Li, K., Zheng, L., Zhang, H., Caughey, B. A., Zhao, Q., Hou, J., Zhang, R., Xu, Y., Cai, H., Li, G., ... Zhang, K. (2017). Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nature Materials*, 16 (11). <https://doi.org/10.1038/NMAT4997>
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2014). Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4591>
- Yuwen, D. L., Sheng, B. B., Liu, J., Wenyu, W., & Shu, Y. Q. (2017). MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21 (11). PMID: 28678319.
- Zarovni, N., Corrado, A., Guazzi, P., Zocco, D., Lari, E., Radano, G., Muhhina, J., Fondelli, C., Gavrilova, J., & Chiesi, A. (2015). Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.028>
- Zhang, Q., Luo, J., Wu, S., Si, H., Gao, C., Xu, W., Abdullah, S. E., Higgs, B. W., Dennis, P. A., van der Heijden, M. S., Segal, N. H., Chaff, J. E., Hembrough, T., Barrett, J. C., & Hellmann, M. D. (2020). Prognostic and predictive impact of circulating tumor dna in patients with advanced cancers treated with immune checkpoint blockade. *Cancer Discovery*, 10 (12). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0047>



Бранислав КОКИЋ

Иновациони центар Хемијског факултета у Београду

Е-пошта: kokicb@chem.bg.ac.rs

ОДАБРАНИ НАПРЕЦИ У ОРГАНСКОЈ ХЕМИЈИ У ПРВОМ КВАРТАЛУ 2025. ГОДИНЕ

ИЗВОД

Одабрана су и укратко описана три рада из савремене литературе органске хемије, која су публикована у првом кварталу 2025. године. Први рад описује нову синтезу природног алкалоида, други описује превазилажење ограничења једне класичне органске реакције, док трећи рад пријављује прво изоловање формиљум-јона.

Кључне речи: синџеза, алкалоид, ибобаин, диазонијум-соли, амини, формиљум-јон

НОВА СИНТЕЗА ИБОГАИНА

Ибогаин је природни психоактивни алкалоид који је у прелиминарним клиничким испитивањима показао обећавајући потенцијал за третман болести зависности од различитих супстанци. Његову широку примену, између осталог, ограничавају нежељени ефекти који угрожавају рад срца. Због тога је тренутно у току потрага за дериватима ибобаина који ће имати упоредиву активност, а који неће изазивати нежељене ефекте. Ајер и сарадници (Iyer et al., 2025) су због актуелности ибобаинске терапије развили ефикасну синтезу ибобаина, погодну за медицинска истраживања јер се може извести на великој скали, у малом броју корака и са добрим укупним приносом, а синтеза започиње из лако доступног и јефтиног пиридина (Схема 1). У првом кораку се врши заштита азота и редукција пиридиновог језгра до електрон-богатог диена. Затим следи Дилс-Алдерова циклоадиција винил-циклопропил кетона и диена при чему се добија једињење **A**. База у овом кораку служи за повећавање

удела *exo* изомера (положај **1**) јер се циклизација касније у синтези изводи на том изомеру, а у циклоадицији се доминантно добија нежељени *endo* производ. Етил-група се затим уводи у молекул на следећи начин: стереоселективна редуктивна радикалска адиција акрилата, катализована гвожђе(III)-ацетилацетонатом (претпостављено је да стереоселективност потиче од координације заштитне групе са азота за гвожђе), за којом следи хидролиза до киселине и фотокаталитичка декарбоксилација. Након тога се бромоводоничном киселином отвара циклопропански прстен и под базним условима изазива циклизација до једињења **B**. Коначно, Фишера синтеза индола, која, с обзиром на то да је последњи корак, омогућава лако добијање деривата ибобаина са различитим супституентима на индоловом језгру употребом одговарајућег хидразина.

Аутори су развили и асиметричну верзију синтезе, која је слична рацемској. Кључни корак увођења хиралности је диастереоселективна Дилс-Алдерова реакција (Схема 2). Након тога, следи хидролиза амида и превођење настале киселине у циклопропил-кетон преко Вајнребовог амида.

ДИАЗОНИЈУМ-СОЛИ АЛИФАТИЧНИХ АМИНА

Превођење примарних амина у диазонијум-соли је робусна и поуздана класична реакција у органској хемији, чији се значај заснива на реактивности насталих соли. Наиме, развијене су бројне методе за супституицију диазонијум-фрагмента соли халогеном, хидрокси-групом, алкил- и арил-групама итд. Ова секвенца од

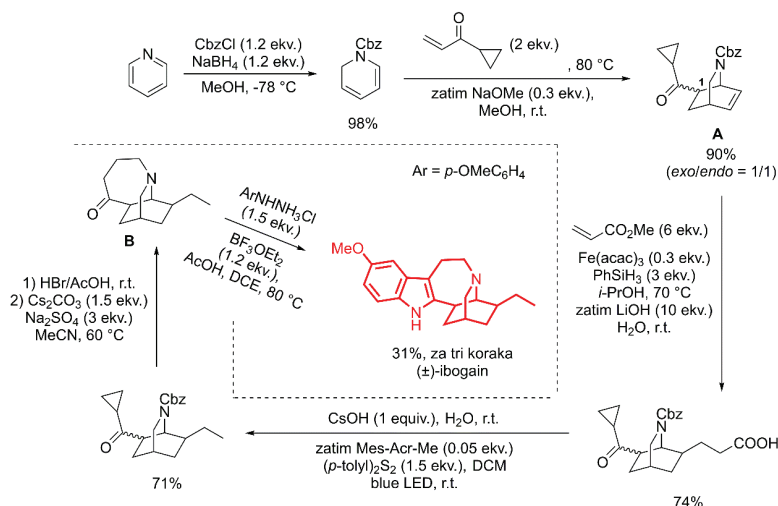


Схема 1. Синтеза рацемског ибобаина

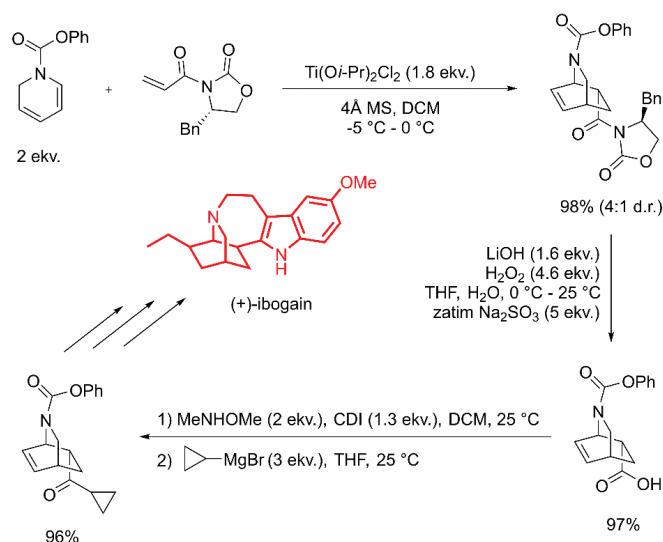


Схема 2. Кључни део асиметричне синтезе (+)-ибобаина

две реакције (диазотовање амина/супституција) има огроман значај у органској хемији јер се на једноставан начин амини, као лако доступне хемикалије и чести мотиви важних молекула, могу превести у друге класе једињења (Схема 3).

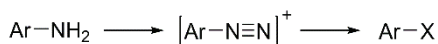


Схема 3. Синтетска стратегија за трансформисање ароматичних примарних амина секвенцом диазотовање/супституција

Међутим, метода је ограничена на ароматичне примарне аminer јер су алифатичне диазонијум-соли изузетно нестабилне и подлежу споредним реакцијама (елиминацији, премештању и реакцији са било којим присутним нуклеофилом). Од самог почетка развоја хемије диазонијум-соли било је јасно да се алифатичне диазонијум-соли не могу „контролисати“, те је стога њихов препаративни значај био ограничен на спорадичне успешне примере који су више представљали изузетак него правило. Ове године је учињен напредак јер су Дурка и сарадници (Durka et al., 2025) развили генералну методу за употребу алифатичних амина као препаративно употребљивих супстрата за секвенцу диазотовање/супституција.

Успех методе се заснива на употреби 1,1,1,3,3,3-хексафлуор-2-пропанола (HFIP-a) као растварача. У последњој деценији су постигнути изванредни резултати употребом HFIP-a у јонским реакцијама због његових специфичних својстава којима утиче на реактивност супстрата и селективност реакција. Дурка и сарадници су претпоставили да су блага киселост, ниска нуклеофилност и снажна способност за грађење водоничних веза били најважнији фактори

HFIP-a који су допринели успешности реакције. Аутори су се фокусирали у раду на Фридел-Крафтсову реакцију, али су показали да се под оптимизованим условима могу извести и друге познате реакције диазонијум-соли, нпр. алкиловање и халогеновање. Процедура се састоји из два корака, при чему други корак (додатак Ханчовог естра и киселине) служи за сузбијање споредних производа, тј. превођење споредних производа у жељене. Различити примарни, секундарни, терцијарни и бензилни примарни алифатични амини су успешно реаговали са (хетеро)ароматичним једињењима у реакцији Фридел-Крафтсовог алкиловања (два примера су приказана на Схеми 4).

ПРВО ИЗОЛОВАЊЕ ФОРМИЛИЈУМ-ЈОНА (HCO^+)

Формилијум-јон (HCO^+) је реактиван катјон који је у органској хемији познат као краткоживећи интермедијер у неким реакцијама. Инструменталним методама је успешно детектован у лабораторији, а и добро је познато да је присутан у свемиру. Међутим, због његове велике реактивности према нуклеофилима, никада није изолован, тако да нека његова својства никада нису могла бити испитана. Штајнер и сарадници (Steiner et al., 2025) су изоловали формилијум-со са $[\text{Sb}_2\text{F}_{11}]^-$ као ањоном. Синтеза се заснива на апстракцији флуорида из нестабилног и испарљивог формил-флуорида снажном Луисовом киселином антимонопентафлуоридом, који има изузетан афинитет на флуору (Схема 5). Било је неопходно извести синтезу на ниској температури и у неконвенционалном растварачу (1,1,1,2-тетрафлуоретану).

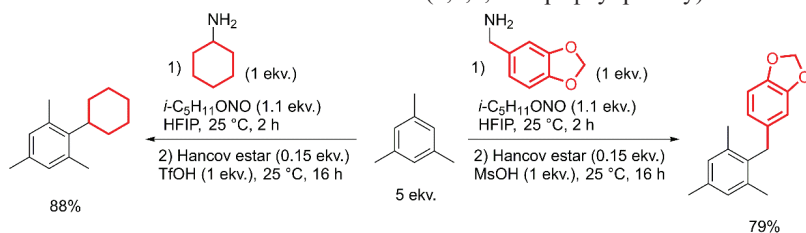


Схема 4. Употреба алифатичних амина као угљеничних електрофила у Фридел-Крафтсовој реакцији

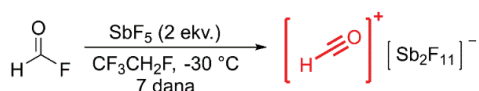


Схема 5. Синтеза соли формиљум-јона

Добијена формиљум-со се у чистом стању распада на температури изнад -55°C . Синтеза формиљум-јона у чистом облику је омогућила његово испитивање дифракцијом Х-зрака по први пут. Из добијених података се види да С-О веза има карактер троструке везе и да је краћа од С-О везе у угљен-моноксиду. На основу вибрационих спектра и кристалне структуре је закључено да флуорови атоми контрајона $[\text{Sb}_2\text{F}_{11}]^-$ снажно стабилизују формиљум-јон и утичу на његову електронску структуру. Та стабилизација је највероватније разлог због којег су аутори успешно изоловали овај реактивни електрофил.

Abstract

SELECTED ADVANCEMENTS IN ORGANIC CHEMISTRY PUBLISHED IN THE FIRST QUARTER OF 2025

Branislav KOKIĆ, Innovative centre, Faculty of Chemistry, Belgrade, Ltd.

Three papers from the current organic chemistry literature, published in the first quarter of 2025, are selected

and briefly described. The first presents a new synthesis of a natural alkaloid, the second describes the improvement to a classic organic chemistry reaction, and the third reports the first isolation of the elusive formylum ion.

Keywords: synthesis, alkaloid, ibogaine, diazotization, amines, formylum ion

ЛИТЕРАТУРА

- Durka, J., Zielińska, B., & Gryko, D. (2024). Aliphatic Amines Unlocked for Selective Transformations through Diazotization. *Angewandte Chemie International Edition*, 64 (7), e202419450. <https://doi.org/10.1002/anie.202419450>
- Iyer, R. N., Favela, D., Domokos, A., Zhang, G., Avanes, A. A., Carter, S. J., Basargin, A. G., Davis, A. R., Tantillo, D. J., & Olson, D. E. (2025). Efficient and modular synthesis of ibogaine and related alkaloids. *Nature Chemistry*, 17, 412-420. <https://doi.org/10.1038/s41557-024-01714-7>
- Steiner, S., Kuhn, T., Jessen, C., Bockmair, V., Virmani, A., & Kornath, A. J. (2025). Efficient Synthesis and Crystal Structure of the HCO^+ Cation. *Journal of the American Chemical Society*, 147 (10), 8361-8366. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c15975>



ВЕСТИ из ШКОЛЕ за



Ивана МИЋИЋ

Гимназија Ивањица

Е-пошта: ivanamicic2023@gmail.com

ХЕМИЈСКИ ИНКУБАТОР: ПРОЈЕКТНА НАСТАВА У ХЕМИЈИ

ИЗВОД

Пројекат „Хемијски инкубатор” представља иновативан приступ у настави природних наука, који интегрише хемију, физику и информатику. Циљ пројекта био је развијање инкубатора за транспорт јаја, који функционише без употребе електричне енергије, користећи топлоту која се ослобађа приликом растварања соли. Кроз овај пројекат, ученици су истраживали како различите количине соли и количине растварача утичу на промену температуре раствора, и развијали своје знање и вештине кроз лабораторијски

рад. Такође, коришћени су информатички алати за дизајнирање модела инкубатора, што је омогућило повезивање теоријског знања са практичном применом. Пројекат је допринео развоју међупредметних компетенција, унапредио вештине тимског рада и побољшао способност решавања стварних проблема коришћењем научних принципа.

Кључне речи: пројектна настава, инкубатор за транспорт јаја, соли, растварање, топлотне промене

УВОД

У савременом образовању велика пажња посвећује се пројектној настави као иновативној методи која омогућава ученицима да активно уче кроз решавање стварних проблема. Пројектна настава интегрише различите дисциплине, подстиче креативност, тимски рад и развој истраживачких способности, те помаже ученицима да повежу теоријска знања са практичним искуствима.

Циљ пројектне наставе описане у овом чланку је развијање предузимљивости и оријентације ученика ка предузетништву кроз повезивање и примену наученог у корелацији наставних садржаја и дисциплина. Инспирација за овај пројекат била је употреба малих врећица које се притиском активирају и брзо загревају, те је специфичан циљ пројекта био да ученици, кроз експериментални рад, истраже растварањем којих соли се ослобађа топлота, како би изабрали најпогоднију со за израду инкубатора. Поред тога, ученици су кроз пројекат примењивали знање из физике и употребљавали информатичке алате за симулације и оптимизацију дизајна инкубатора.

ПРОБЛЕМ КОЈИ ЈЕ ПОСТАВЉЕН ПРЕД УЧЕНИКЕ

У наставку је описан проблем чијим решавањем су се ученици бавили током израде пројекта.

На рубу града постојала је стара фабрика за производњу њилића. Стари власник фабрике, господин Пејровић, одлучио је да се повуче из посла и прода фабрику. Нова власница, госпођа Ковачевић, имала је велике планове за фабрику. Госпођа Ковачевић је желела да модернизује фабрику и премести је на другу локацију како би повећала производњу. Међутим, постојао је проблем – требало је преместити инкубаторе у којима се већ дешава процес развића са једне локације на другу. Транспорти би трајао један сат. Били су јој потребни инкубатори за транспорти који раде без напона струје. Нови инкубатори на соларну енергију су представљали скупу инвестицију, и због тога је решила да истражи јефтиније решење проблема. Обратила се друштво младих хемичара за помоћ. Они су прихватили изазов и тимски кренули у решавање проблема.

МЕТОДОЛОГИЈА

Описана пројектна настава реализована је са ученицима првог разреда, општег смера, Гимназије у Ивањици. Реализација се одвијала током осам недеља и обухватала је шест етапа:

1. циљна етапа (1. недеља),
2. аналитичка етапа (2. недеља)
3. истраживачка етапа (3-4. недеља)
4. конструктивна етапа (5-6. недеља)
5. презентациона етапа (7. недеља)
6. рефлексивно-оцењивачка етапа (8. недеља)

У оквиру сваке етапе, постављен је задатак те етапе, и описане конкретне активности наставника и ученика.

1. Циљна етапа

Задатак: Одређивање теме, основног и специфичног циља пројектне наставе, дефинисање исхода као ставова и вештина које се оваквим приступом развијају и унапређују.

Активности наставника - пружа помоћ у постављању теме, постављању циљева пројектне наставе и организовању рада групе, даје упутства и објашњења за реализацију задатака.

Активности ученика - разматрају предмет истраживања, анализирају добијена упутства и задатаке, анализирају циљеве истраживања.

2. Аналитичка етапа

Задатак: Табеларни приказ задатака и активности по фазама. Утврђивање извора информација. Избор ресурса потребних у раду. Постављање задатака на таблу Padlet. Упознавање са свим критеријумима који су неопходни за успешну реализацију пројектне активности.

Активности наставника - даје предлоге за избор правог извора информација, тумачи начин прикупљања и анализе информација.

Активности ученика - одабирају извор информација, формулишу задатке за рад појединаца у групи.

3. Истраживачка етапа

Задатак: Истраживачки рад у лабораторији, анализа и селекција прикупљеног материјала.

Активности наставника - обавља консултације са групом и координаторима групе, прати рад ученика, прати остварење временске динамике.

Активности ученика - остварују задатке предвиђене планом групе, истражују у хемијској лабораторији, остварују задатке везане за теоријски део пројекта, раде на дизајну инкубатора.

4. Конструктивна етапа

Задатак: Анализа остварености исхода постављених задатака у пројектној настави. Анализа прикупљених информација.

Активности наставника - сагледава недостатке, обавља консултације са ученицима ради њиховог превазилажења, ради на документацији за пројектну наставу.

Активности ученика - анализирају и селекују прикупљене информације, конструишу пројекат, повезују истраживачки рад у лабораторији са теоријским знањима из хемије и физике, и дизајнирају инкубатор.

5. Презентациона етапа

Задатак: Презентовање продуката и резултата пројектне наставе.

Активности наставника - организује презентацију пројекта.

Активности ученика - јавна одбрана пројектне активности, одговарају на питања присутних, тумаче присутнима активности и резултате.

6. Рефлексивно – оцeњивачка eтпaпa

Зaдaтaк: Оцeнa рeзултaтa пројектнe нaстaвe нa oснoву фoрмулисaних критeријумa. Прoцeнa индивидуaлних aктивнoсти, прoцeнa рaдa групe, oцeњивaњe и врeднoвaњe рaдa учeникa и нaстaвникa. Aнaлизa oствaрeнoсти тeмe, идeјe и циљa пројектнe нaстaвe (гугл упитик). Врeднoвaњe aктивнoсти. Прaвљeњe плaнa кoјим ћe сe aктивнoсти пројектнe нaстaвe пoдићи нa виши нивo.

Активност наставника - рефлексивна процена реализације пројектне наставе по етапама на основу анализе попуњених „чекинг“ листа, пружање повратних информација и давање предлога за унапређење вештина и ставова.

Активност ученика - рефлексивна целокупног процена реализације пројектне наставе, самовредновање и вршњачко вредновање пројектне наставе, анализирање остварености међупредметних компетенција на нивоу групе.

УПУТСТВА И ЗАДАЦИ ЗА УЧЕНИКЕ

Сви ученици су пролазили активности у лабораторији, а након завршеног лабораторијског рада, ученици су били подељени у три групе према нивоу знања (основни, средњи, напредни ниво). Свакој групи додељени су различити теоријски задаци које је било потребно да реше, а касније да презентују решења. У наставку су наведени задаци за ученике.

Лабораторијски део

1. Истраживање литeрaтyрe и интeрнeтa:

Претражите доступну литературу и интернет изворе како бисте пронашли на који начин функционишу врећице које се загреју након што се прстима „пукну“ изнутра. Истражите на чему се заснива овај процес и које супстанце се користе у тим врећицама. Припремите кратак извештај о својим сазнањима.

2. Идентификација соли са екзотермним ефектом растварања:

Претражите литературу и интернет изворе како бисте пронашли које све соли приликом растварања у води ослобађају топлоту (егзотермне промене). Направите списак назива/формула тих соли и забележите основне информације о њиховој доступности и цени.

3. Планирање и извођење огледа

На основу претходно прикупљених информација планирајте огледе којима ћете проверити која је со најпогоднија за постизање одговарајуће температуре раствора. Напишите процедуру огледа која укључује потребан материјал, опрему и кораке које ћете предузети.

При изради плана огледа, водите рачуна о следећем:

- Изаберите различите соли и одредите почетне количине за испитивање.
- Планирајте мерење температуре раствора добијеног растварањем соли у води.

- Направите план испитивања утицаја различитих количина соли и количине воде на промену температуре.

4. Извођење огледа и анализа резултата:

Изведите планиране огледе у лабораторији, водећи рачуна о безбедности и тачности мерења. Резултате огледа прикажите табеларно, са јасно назначеним параметрима као што су врста соли, количина соли, количина воде и постигнута температура.

5. Анализа и образложење избора соли:

На основу добијених резултата, анализирајте која со је најпогоднија за употребу у инкубатору. Образложите свој избор узимајући у обзир следеће критеријуме:

- Приликом растварања соли потребно је да се ослободи довољно топлоте како би се постигла одржива температура раствора.
- Со не сме бити скупа и мора бити лако доступна.
- Потребна је оптимизација количине соли како не би била превелика за употребу у преносивом инкубатору.

Припремите извештај који укључује све фазе вашег истраживања, анализу резултата и препоруке за избор најбоље соли за примену у дизајну хемијског инкубатора.

Теоријски задаци

Основни ниво:

1. Објасните појам енергије јонизације. Наведите како енергија јонизације зависи од полупречника атома и како се мења у групи и у периоди Периодног система елемената.
2. Дефинишите афинитет према електрону, опишите како он зависи од полупречника атома и како се мења у групи и периоди Периодног система елемената. Да ли племенити гасови имају афинитет према електрону?
3. Објасните разлику између ендотермних и екзотермних процеса. Наведите пет примера за сваки од ових процеса. **Практичан задатак:** Направите презентацију и припремите се за излагање својих одговора.

Средњи ниво:

1. Опишите детаљно процес растварања соли у води. Шта се дешава са јонима када се со раствара?
2. Објасните шта представља стандардна промена енталпије кристалне структуре и како утиче на стабилност јонских једињења.
3. Дефинишите стандардну промену енталпије хидратације и њен значај у растварању јонских једињења.
4. Објасните шта је стандардна промена енталпије растварања. Наведите разлоге зашто је процес растварања неких соли екзотерман, а других ендотерман, са освртом на со коју сте изабрали као најпогоднију током лабораторијског рада. **Практичан задатак:** Направите презентацију и припремите се за излагање својих одговора.

Найпредни ниво:

1. Објасните Борн-Хаберов циклус и његову примену на примеру изабране соли. Опишите улогу енталпија формирања, енергије јонизације, афинитета према електрону, енталпије кристалне структуре и енталпије хидратације.
2. Израчунајте количину топлоте која се ослобађа при растварању изабране соли у води, користећи податке о енталпији растварања добијене током лабораторијских огледа.
3. Израчунајте масу изабране соли која је потребна да би се температура раствора, у коме се налази 500 cm³ воде, повећала за 10 °C. Приликом израчунавања користите специфични топлотни капацитет воде (4.18 J · g⁻¹ °C⁻¹) и резултате добијене током огледа.

Практични задатак: Снимите видео презентацију у трајању од 5 до 7 минута у којој тим објашњава Борн-Хаберов циклус и начин израчунавања енталпије за одабрану со. Видео треба да укључи графички приказ циклуса и објашњење сваког корака.

Дизајнирање инкубатора (заједнички задатак за све групе)

1. Осмислите дизајн паковања које може да служи као преносиви извор топлоте за хемијски инкубатор, користећи со коју сте изабрали као најпогоднију. Укључите безбедносне аспекте, ефикасност и економичност.
2. Направите предлог за дизајн инкубатора који користи топлоту ослобођену приликом растварања изабране соли. Укључите скицу, потребне материјале и објасните како би се могла контролисати температура унутар инкубатора.

ОЧЕКИВАНИ ИСХОДИ

Примена овако планиране пројектне наставе требало би да резултује бројним исходима који се односе како на хемијска знања, тако и на експерименталне и друге вештине. Неки од њих наведени су у наставку.

Разумевање појмова, промена и процеса:

- Ученици објашњавају појам енталпије.
- Ученици уочавају да приликом процеса растварања соли долази до топлотних промена.
- Ученици објашњавају промену температуре раствора насталог растварањем различитих соли у односу на температуру растварања.
- Ученици објашњавају практични значај топлотног ефекта растварања соли и како то утиче на околину.

Дубље разумевање термодинамичких принципа:

- Ученици објашњавају повезаност енталпија кристалне структуре, енталпија хидратације и енталпија растварања.
- Ученици примењују знање о Борн-Хаберовом циклусу на примерима као што је калцијум-хлорид, објашњавајући топлотне промене током растварања соли.

Експерименталне вештине:

- Ученици правилно спроводе основне лабораторијске технике, укључујући мерење температуре и растварање соли у води.
- Ученици приказују резултате свог истраживања табеларно и графички.

Вештине истраживања и анализе података:

- Ученици анализирају податке добијене експерименталним радом и идентификују факторе (врста соли, количина соли, количина воде) који утичу на количину ослобођене топлоте.
- Ученици формирају хипотезе и објашњавају како би одређени фактори могли утицати на рад инкубатора.

Примена знања из физике и рачунарских вештина:

- Ученици користе знања из физике да израчунају потребну количину соли за постизање жељене температуре.
- Ученици користе рачунарске симулације и програме за дизајнирање инкубатора.

Развијање креативности и тимског рада:

- Ученици учествују у дизајну и изради модела инкубатора користећи различите материјале и технолошке ресурсе.
- Кроз тимски рад ученици развијају способност решавања практичних проблема ослањајући се на међупредметну повезаност (хемија, физика, информатика).

КОРИШЋЕНИ РЕСУРСИ

Приликом реализације описане пројектне наставе коришћени су ресурси у виду лабораторијске опреме, информатичких алата и доступне литературе. Детаљнији приказ употребљених ресурса приказан је у наставку.

Лабораторијска опрема:

- Прибор и посуђе: стаклене чаше, термометри, мензуре, кашичице, дигиталне ваге.
- Хемикалије: соли (натријум-ацетат, натријум-хлорид, калцијум-хлорид), дестилована вода

Информатички алати:

- Рачунари са софтверима за симулацију и моделирање.
- Програми за анализу података који ученицима помажу у приказивању резултата експеримената, као и за визуализацију процеса (Excel, Python).

Литература и истраживачки ресурси:

- Научни радови, књиге из области хемије, физике.
- Интернет ресурси и базе података који нуде научне информације о термодинамици, растворима и топлотним променама.

Табела 1. Веза између задатака и међупредметних компетенција

Задатак	Међупредметна компетенција
Прихватање изазова	Предузимљивост
Економски исплатива и одржива производња	Оријентација ка предузетништву
Обезбеђивање одговарајуће температуре у инкубатору	Решавање проблема
Прикупљање и селектовање информација и података	Рад са подацима и информацијама
Прављење видео анимације	Дигитална компетенција
Дизајнирање инкубатора	Естетичка компетенција
Тимско решавање проблема	Сарадња

ПРЕДНОСТИ ПРИМЕЊЕНОГ ПРИСТУПА

Главне добити примењеног приступа огледају се у иновативности, подизању мотивације ученика за рад, и развијању међупредметних компетенција.

Овај пројекат представља **иновацију** у настави хемије и других природних наука у односу на досадашњи рад, јер користи међупредметни приступ који повезује хемију, физику и информатику. Често се научне дисциплине подучавају одвојено, али овим пројектом ученици су имали прилику да виде како се различите области науке могу комбиновати за решавање конкретних проблема.

Мотивација ученика за рад на овом пројекту била је висока, јер су имали прилику да решавају стварни проблем који се односи на пренос и чување јаја, у којима се већ дешава процес развића, без коришћења електричне енергије. Овај проблем је изазвао њихову радозналост и жељу за експериментисањем, што је утицало на њихов активан приступ и ангажовање у свим фазама пројекта. Осим тога, приликом дизајнирања инкубатора кроз тимски рад подстакнут је и развој креативности.

Примењен вид наставе помаже ученицима да развијају више различитих **међупредметних компетенција**. У Табели 1 је дат преглед конкретних задатака који су допринели развијању одређене међупредметне компетенције.

ЗАКЉУЧАК

Пројекат „Хемијски инкубатор” представља пример успешне интеграције природних наука и примене научних принципа у дизајнирању функционалних уређаја. Овај приступ није само омогућио ученицима да развију предметне компетенције, већ и да учествују у тимском раду, развијају критичко мишљење, креативно решавају проблеме и примењују савремене технологије.

Овај пример пројектне наставе се може модификовати, прилагодити ученицима и њиховим интересовањима и могућностима. Могуће је укључити и остале наставне предмете као што су биологија или ликовна култура.

Abstract

CHEMICAL INCUBATOR: PROJECT-BASED LEARNING IN CHEMISTRY

Ivana MIČIĆ, Grammar School Ivanjica

The „Chemical Incubator” project represents an innovative approach in natural sciences education, integrating chemistry, physics and informatics. The project aimed to develop an incubator that operates without electrical energy, utilizing the heat released during the dissolution of salts. Through this project, students explored how different salts and solvent quantities affect temperature changes, and developed their knowledge through laboratory experiments. Additionally, informatics tools were used to design incubator models, allowing students to connect theoretical knowledge with practical applications. The project facilitated the development of multidisciplinary competencies, enhanced teamwork skills, and improved the ability to solve real-world problems using scientific principles.

Keywords: project-based learning, egg transport incubator, salt, dissolution, heat changes