



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Маја С. Савић

**АНТИТУМОРСКИ ЕФЕКТИ КОМПЛЕКСА
РУТЕНИЈУМА II У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИМ
МОДЕЛИМА КОЛОРЕКТАЛНОГ КАРЦИНОМА
IN VITRO И *IN VIVO***

докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Maja S. Savić

**ANTITUMORSKI EFEKTI KOMPLEKSA
RUTENIJUMA II U EKSPERIMENTALNIM
MODELIMA KOLOREKTALNOG KARCINOMA
IN VITRO I *IN VIVO***

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Maja S. Savic

**ANTITUMOR EFFECTS OF THE RUTHENIUM II
COMPLEXES IN EXPERIMENTAL MODELS OF
COLORECTAL CARCINOMA *IN VITRO* И *IN
VIVO***

doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

| I Аутор | |
|--|--|
| Име и презиме: Маја С. Савић | |
| Датум и место рођења: 01.04.1989. године, Аранђеловац | |
| Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу | |
| II Докторска дисертација | |
| Наслов: Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | |
| Број страница: 133 | |
| Број слика: 14 слика, 3 табеле, 39 графикона, 3 схеме | |
| Број библиографских података: 256 | |
| Установа и место где је рад израђен: Центар за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија; Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу | |
| Научна област (УДК): Медицина | |
| Ментор: др rer. nat. Слободан Новокмет, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу | |
| III Оцена и одбрана | |
| Датум пријаве теме: 02.08.2017. године | |
| Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-829/49, дана 08.09.2017. године | |
| Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: | |
| 1. Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник | |
| 2. Проф. др Тибор Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан | |
| 3. Проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан | |
| Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: | |
| Датум одбране дисертације: | |

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

| I Autor |
|---|
| Ime i prezime: Maja S. Savić |
| Datum i mesto rođenja: 01.04.1989. godine, Aranđelovac |
| Sadašnje zaposlenje: Asistent za užu naučnu oblast Farmaceutska biotehnologija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu |
| II Doktorska disertacija |
| Naslov: Antitumorski efekti kompleksa Rutenijuma II u eksperimentalnim modelima kolorektalnog karcinoma <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> |
| Broj stranica: 133 |
| Broj slika: 14 slika, 3 tabele, 39 grafikona, 3 sheme |
| Broj bibliografskih podataka: 256 |
| Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Centar za molekulska medicinu i istraživanje matičnih ćelija; Laboratorija za kardiovaskularnu fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu |
| Naučna oblast (UDK): Medicina |
| Mentor: dr rer. nat. Slobodan Novokmet, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu |
| III Ocena i odbrana |
| Datum prijave teme: 02.08.2017. godine |
| Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-829/49, dana 08.09.2017. godine |
| Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: |
| 1. Prof. dr Miodrag Stojković, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik |
| 2. Prof. dr Tibor Sabo, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija, član |
| 3. Prof. dr Marija Milovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član |
| Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: |
| Datum odbrane disertacije: |

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

| I Author |
|---|
| Name and surname: Maja S. Savic |
| Date and place of birth: 01.04.1989. Arandjelovac |
| Current employment: Teaching assistant for the narrow scientific field of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| II Doctoral Dissertation |
| Title: Antitumor effects of Ruthenium II complexes in experimental models of colorectal cancer <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> |
| No. of pages: 133 |
| No. of images: 14 pictures, 3 tables, 39 charts, 3 schemes |
| No. of bibliographic data: 256 |
| Institution and place of work: The Centar for molecular medicine and stem cell research; Laboratory for Cardiovascular Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| Scientific area (UDC): Medicine |
| Mentor: dr rer. nat. Slobodan Novokmet, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| III Grade and Dissertation Defense |
| Topic Application Date: 02.08.2017. |
| Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-829/49, 08.09.2017. |
| Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: |
| <ol style="list-style-type: none">1. Prof. dr Miodrag Stojkovic, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Genetics, president2. Prof. dr Tibor Sabo, full professor at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade for the narrow scientific field of General and Inorganic Chemistry, member3. Prof. dr Marija Milovanovic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Microbiology and Immunology, member |
| Commission for evaluation and defense of doctoral dissertation: |
| Date of Dissertation Defense: |

Захвалница

Од свег срца се захваљујем проф. др Владимиру Јаковљевићу на указаном поверењу, шанси за рад и усавшавање, подрици, помоћи и разумевању. Хвала што сте ми омогућили рад у Вашој лабораторији, лабораторији за кардиоваскуларну физиологију. Хвала и свим члановима исте на пренесеном знању из области научно-истраживачког рада, колегијалности, али и свим пријатељским саветима које су ми пружили.

Свом ментору, проф. др Слободану Новокмет захваљујем на уложеном труду приликом осмишљавања и израде докторске дисертације, стручним и корисним саветима, стрљењу и подрици.

Желим да се захвалим и свим члановима Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, на челу са проф. др Небојшом Арсенијевић, што су се опходили према мени као према равноправном члану њихове лабораторије.

Посебно се срдечно захваљујем проф. др Марији Миловановић, на посвећености сваком експерименту, пренесеном знању, свеукупном добриносy и залагању за ову докторску дисертацију.

Неизмену захвалност дугујем својој породици, оцу, мајци, браћи, а посебно свом супругу Душану, ћерки Круни и сину Јакову, без њихове безусловне љубави и подршке ове докторске дисертације данас не би било.

У Крагујевцу, 2021. године.

Маја Савић

САЖЕТАК

Увод: Комплекси платине, цисплатина и њени аналози - карбоплатина и оксалиплатина сврставају се у најчешће коришћене антитуморске металофармацеутике. Поред клиничког успеха који поседују, наведени лекови имају и одређена ограничења, а то су системска токсичност (нефротоксичност, хепатотоксичност, неуротоксичност, мијелотоксичност и гастроинтестинална токсичност) и учесталост резистенције на њихову примену. Ова ограничења су покренула истраживања за другим комплексима прелазних метала сличне антитуморске активности али прихватљивијег профила токсичности. Комплекси рутенијума привукли су велико интересовање као потенцијални антитуморски агенси и то су једини неплатински комплекси који су ушли у фазу клиничког тестирања као хемиотерапеутици.

Циљ: Циљ овог истраживања је био да испита цитотоксичне ефекте рутенијум(II) терпиридин комплекса, $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (Ru-1) и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (Ru-2) према хуманим и мишјим ћелијским линијама карцинома колона и мишјим мезенхималним матичним ћелијама помоћу *in vitro* метода. Поред тога, циљ је био да се испита антитуморска активност *in vivo* и системска токсичност рутенијум(II) терпиридинских комплекса у хетеротопском моделу карцинома колона и да се упореди са оксалиплатином, која је најчешће коришћени металофармацеутик у лечењу карцинома колона.

Материјал и методе: Ћелијске линије на којима су испитивани цитотоксични ефекти комплекса рутенијума(II) помоћу МТТ теста су: ћелије карцинома колона изоловане из BALB/c мишева - СТ26, ћелијска линија хуманог колоректалног аденокарцинома (*Dukes B*) - SW480, ћелијска линија хуманог епителног колоректалног карцинома - HCT116 и мезенхималне матичне ћелије миша изоловане из костне сржи C57Bl/6 мишева. Исте ћелијске линије су коришћене за испитивање утицаја рутенијум(II) терпиридинских комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса и тип ћелијске смрти, коришћењем LDH теста и проточне цитофлуориметрије након бојења ћелија одговарајућим флуорохромима. У *in vivo* експериментима су коришћени мишеви BALB/c соја, мушког пола, старости 6-8 недеља, масе од 20-25 грама. Модел хетеротопског карцинома колона индукован је субкутаном инјекцијом 1×10^6 сингених СТ26 ћелија суспендованих у 100 μl DMEM медијума у дорзолумбалну регију миша. Сваки комплекс је појединачно растворен у 200 μl физиолошког раствора и примењен у дози од 2 и 5 mg/kg. Интраперитонеална апликација испитиваних комплекса спроведена је по шеми: 6., 9., 12. и 15. дана од инокулације СТ26 туморских ћелија. Мишеви су сврстани у групе у зависности од тога чиме су третирани: контрола (физиолошки раствор), Ru-1, Ru-2 и оксалиплатина. Маса мишева је мерена сваки трећи дан, непосредно пре апликације испитиваних комплекса, како би дозирање било што прецизније. Експеримент је трајао укупно 18 дана, а мишеви су жртвовани 13. дан од прве апликоване дозе и том приликом је сакупљена крв и изоловани су унутрашњи органи као и примарна туморска маса за даље анализе. Ради процене системске токсичности примењених комплекса спроведене су биохемијске анализе урее, креатинина, као и ензима јетре АСТ и АЛТ из крви, а изоловани органи су патохистолошки анализирани. Из ткива изолованих органа одређивани су: маркер оксидационог стреса - индекс липидне пероксидације, ензими антиоксидационе заштите (супероксид-дисмутаза и каталаза) и неензимски антиоксиданс – редуковани глутатион.

Резултати: Комплекси рутенијума(II) испољили су умерену до јаку цитотоксичност према хуманим (HCT116 и SW480) и мишјој (CT26) ћелијској линији карцинома колона и мишјим мезенхималним матичним ћелијама, са вредностима IC₅₀ у распону од 19,1 до 167,3 μМ. Рутенијум(II) терпиридински комплекси су код хуманих и мишјих ћелија карцинома колона индуковали апоптозу у ниском проценту, док је тај проценат био знатно виши код мишјих мезенхималних матичних ћелија. Са друге стране, комплекси рутенијума(II) су индуковали у значајном проценту некрозу ћелија карцинома колона и мишјих мезенхималних матичних ћелија. Такође, оба комплекса су специфично за ћелијску линију индуковали поремећаје ћелијског циклуса, односно индуковали су застој најчешће у G2/M фази ћелијског циклуса. Комплекс [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] је значајно инхибирао раст примарног хетеротопског тумора код мишева, подједнако или чак боље од оксалиплатине, у зависности од примењене дозе. Оба испитивана рутенијум(II) терпиридин комплекса су довела до озбиљнијег оштећења јетре, бубрега и срца, у поређењу са оксалиплатином, што је процењено на основу биохемијских анализа (уреа, креатинина, АСТ и АЛТ) и хистопатолошке анализе органа. С обзиром на забележене повишене вредности TBARS у ткиву срца и бубрега код мишева третираних комплексима рутенијума(II), претпоставља се да индукција оксидативног стреса услед њихове примене може имати улогу у испољавању системске токсичности.

Закључак: Анализом резултата нашег истраживања, долазимо до закључка да рутенијум(II) терпиридински комплекс - [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] испољава значајну цитотоксичну активност према хуманим и мишјим ћелијским линијама карцинома колона, али и мишјим мезенхималним матичним ћелијама, као и да поседује *in vivo* антитуморску активност код мишева којима је индукован CT26 карцином колона, слично оксалиплатини, али уз израженију хепатотоксичност, нефротоксичност и кардиотоксичност у поређењу са оксалиплатином.

Кључне речи: рутенијум(II) комплекси, цитотоксичност, оксалиплатина, карцином колона, мезенхималне матичне ћелије.

ABSTRACT

Introduction: Platinum complexes, cisplatin and its analogues - carboplatin and oxaliplatin are among the most commonly used antitumor metallopharmaceuticals. Beside their clinical success, there has been some limitations observed: systemic toxicity (nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, myelotoxicity and gastrointestinal toxicity) and the incidence of innate or acquired drug resistance. These limitations have initiated new investigations for other transition metal complexes that will show similar antitumor activity but being less toxic. Ruthenium complexes have attracted considerable interest as potential antitumor agents and these are the only non-platinum complexes that have entered the clinical testing phase as chemotherapeutics.

Objective: The aim of this study was to examine cytotoxic effects of ruthenium(II) terpyridine complexes, [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] (Ru-1) and [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] (Ru-2) towards human and murine colon carcinoma cell lines and mouse mesenchymal stem cells, by *in vitro* methods. In addition, the goal was to be examined antitumor activity *in vivo* and systemic toxicity of ruthenium(II) terpyridine complexes in mouse heterotopic model of colorectal carcinoma and compared with oxaliplatin, the most usually used metallopharmaceuticals against colorectal carcinoma.

Materials and Methods: The cell lines on which the cytotoxic effects of the ruthenium(II) complex were examined using the MTT test are: colon carcinoma cells isolated from BALB/c mice - CT26, human colorectal adenocarcinoma cell line (Dukes B) - SW480, human epithelial colon carcinoma cell line - HCT116 and mouse mesenchymal stem cells isolated from bone marrow of C57Bl/6 mice. The same cell lines were used to examine the effects of ruthenium(II) terpyridine complexes on cell cycle distribution and cell death type, using the LDH assay and flow cytometry after staining the cells with the appropriate fluorochromes. The male BALB/c mice, age of 6–8 weeks, with weight around 20–25 g were used in *in vivo* experiment. A model of heterotopic colon cancer was induced by subcutaneous injection of 1×10^6 syngeneic CT26 cells suspended in 100 μ l of DMEM into the dorsolumbar region of the mouse. Each complex was individually dissolved in 200 μ l of saline and administered at a dose of 2 and 5 mg/kg. Intraperitoneal application of the examined complexes was performed according to the scheme: 6, 9, 12 and 15 days after inoculation of CT26 tumor cells. The mice were divided into groups depending on which were treated with: control (saline), Ru-1, Ru-2 and oxaliplatin. The weight of the mice was measured every third day, immediately before the application of the tested complexes, in order to make the dosing as accurate as possible. The experiment lasted 18 days in total, mice were sacrificed on day 13 of the first administered dose and on that occasion blood was collected and internal organs as well as the primary tumor mass were isolated for further analysis. In order to assess the systemic toxicity of the applied complexes, biochemical analyzes of urea, creatinine, as well as liver enzymes AST and ALT from the blood were determined, and isolated organs were pathohistologically analyzed. From the tissues of isolated organs, the following were determined: oxidative stress marker - lipid peroxidation index, antioxidant protection enzymes (superoxide dismutase and catalase) and non - enzymatic antioxidant - reduced glutathione.

Results: Ruthenium(II) complexes showed moderate to strong cytotoxicity toward human (HCT116 and SW480) and mouse (CT26) colon carcinoma cell lines and mouse mesenchymal stem cells with IC_{50} values ranged between 19,1 to 167,3 μ M. Ruthenium (II) terpyridine complexes induced apoptosis in human and mouse colon cancer cells in a low

percentage, while this percentage was significantly higher in mouse mesenchymal stem cells. On the other hand, ruthenium(II) complexes induced necrosis of colon cancer cells and mouse mesenchymal stem cells. Also, both complexes induced cell cycle disturbances, but these effects were specific for the cell line, respectively, induced arrest of cell cycle most often in the G2/M phase. The $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ complexes significantly inhibited growth of primary heterotopic tumor in mice, equally or even better to oxaliplatin, depending on the dose administered. Both examined ruthenium(II) terpyridine complexes led to more serious liver, kidney and heart damage, compared to oxaliplatin, which was assessed on the basis of biochemical analysis (urea, creatinine, AST and ALT) and histopathological analysis of organs. Given the observed elevated values of TBARS in cardiac and renal tissue in mice treated with ruthenium (II) complexes, it is assumed that the induction of oxidative stress due to their application may play a role in the use of systemic toxicities.

Conclusion: Our data highlight the significant cytotoxic activity of $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ against human and mouse colon carcinoma cells as well as *in vivo* antitumor activity in CT26 tumor bearing mice similar to chemioterapeutic oxaliplatin, but with more pronounced hepatotoxicity, nephrotoxicity and cardiotoxicity in comparison with oxaliplatin.

Keywords: ruthenium(II) complexes, cytotoxicity, oxaliplatin, colon carcinoma, mesenchymal stem cells.

САДРЖАЈ

| | |
|---|-----------|
| САДРЖАЈ | I |
| 1. УВОД | 5 |
| 1.1. Одлике и развој тумора..... | 5 |
| 1.2. Утицај цитостатика на ћелијске механизме тумора..... | 7 |
| 1.2.1. Ћелијски циклус..... | 8 |
| 1.2.2. Ћелијска смрт..... | 10 |
| 1.2.3. Имунски одговор..... | 12 |
| 1.2.4. Оксидациони статус..... | 13 |
| 1.3. Металофармацеутици..... | 16 |
| 1.3.1. Комплекси рутенијума као потенцијални металофармацеутици..... | 17 |
| 1.3.2. Механизми антитуморског дејства комплекса рутенијума..... | 24 |
| 1.4. Токсичност индукована применом металофармацеутика..... | 28 |
| 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА | 32 |
| 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ | 34 |
| 3.1. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси..... | 34 |
| 3.2. Ћелијске линије и култивација ћелија..... | 35 |
| 3.3. <i>In vitro</i> методе за испитивање цитотоксичног потенцијала рутенијум(II) терпиридин комплекса..... | 36 |
| 3.3.1. МТТ тест..... | 36 |
| 3.3.2. Тест за одређивање активности лактат-дехидрогеназе (LDH тест)..... | 37 |
| 3.3.3. Тест за детекцију апоптозе (<i>Annexin V/PI</i>)..... | 37 |
| 3.4. Анализа ћелијског циклуса..... | 38 |
| 3.5. <i>In vivo</i> експерименти..... | 39 |
| 3.5.1. Лабораторијске животиње..... | 39 |
| 3.5.2. Индукција експерименталног модела карцинома колоне..... | 39 |
| 3.6. Евалуација потенцијалне системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса..... | 40 |
| 3.6.1. Биохемијске анализе..... | 40 |
| 3.6.2. Патохистолошка анализа..... | 41 |
| 3.6.3. Тест вруће плоче..... | 41 |
| 3.6.4. Проточна цитометрија..... | 42 |
| 3.6.5. Параметари оксидационог стреса..... | 42 |
| 3.6.5.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS)..... | 42 |
| 3.6.5.2. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)..... | 43 |
| 3.6.5.3. Одређивање активности каталазе (CAT)..... | 43 |
| 3.6.5.4. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.7. Статистичка обрада података | 44 |
| 3.7.1. Снага студије и величина узорка..... | 44 |
| 4. РЕЗУЛТАТИ..... | 46 |
| 4.1. Резултати МТТ теста | 46 |
| 4.1.1. Рутенијум(II) терпиридин комплекси редукују вијабилност ћелија карцинома колона миша - СТ26..... | 47 |
| 4.1.2. Рутенијум(II) терпиридин комплекси редукују вијабилност ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116 | 49 |
| 4.1.3. Рутенијум(II) терпиридин комплекси редукују вијабилност ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480 | 51 |
| 4.1.4. Рутенијум(II) терпиридин комплекси редукују вијабилност ћелија мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs..... | 53 |
| 4.2. Резултати LDH теста | 56 |
| 4.2.1. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране карцинома колона миша - СТ26 | 56 |
| 4.2.2. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116 | 57 |
| 4.2.3. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480 | 58 |
| 4.2.4. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs..... | 59 |
| 4.3. Резултати теста за детекцију апоптозе (<i>Annexin V/PI</i>)..... | 60 |
| 4.3.1. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти ћелија карцинома колона миша - СТ26..... | 60 |
| 4.3.2. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116 | 62 |
| 4.3.3. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480 | 63 |
| 4.3.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs | 64 |
| 4.4. Резултати анализе ћелијског циклуса..... | 66 |
| 4.4.1. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса ћелија карцинома колона миша - СТ26..... | 66 |
| 4.4.2. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116..... | 68 |
| 4.4.3. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480 | 69 |
| 4.4.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs..... | 70 |
| 4.5. Антитуморски ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса <i>in vivo</i> | 71 |
| 4.6. Евалуација системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса..... | 74 |
| 4.6.1. Преживљавање и телесна маса мишева | 74 |

| | |
|--|-----|
| 4.6.2. Процена нефротоксичности рутенијум(II) терпиридин комплекса | 78 |
| 4.6.3. Процена хепатотоксичности рутенијум(II) терпиридин комплекса | 80 |
| 4.6.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на време до реакције у тесту вруће плоче (процена неуротоксичности) | 82 |
| 4.6.5. Патохистолошка анализа | 83 |
| 4.6.6. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на заступљеност ћелија имуног система у периферној крви | 93 |
| 4.6.7. Оксидациони статус здравог и туморског ткива мишева | 97 |
| 4.6.7.1. Ниво TBARS у хомогенату здравог и туморског ткива мишева | 97 |
| 4.6.7.2. Ниво редукованог глутатиона (GSH) у хомогенату здравог и туморског ткива мишева | 98 |
| 4.6.7.3. Активност супероксид-дисмутазе (SOD) у хомогенату здравог и туморског ткива мишева..... | 99 |
| 4.6.7.4. Активност каталазе (CAT) у хомогенату здравог и туморског ткива мишева..... | 100 |
| 5. ДИСКУСИЈА | 102 |
| 5.1. Цитототоксично дејство рутенијум(II) терпиридин комплекса на ћелијске линије карцинома колона и мезенхималне матичне ћелије миша | 102 |
| 5.2. Тип ћелијске смрти индукован рутенијум(II) терпиридин комплексима | 104 |
| 5.3. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса | 105 |
| 5.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на инхибицију раста карцинома колона миша <i>in vivo</i> | 106 |
| 5.5. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на системска оштећења | 107 |
| 5.6. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на заступљеност појединих ћелија имуноског система у периферној крви | 110 |
| 5.7. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на редокс статус у ткиву..... | 111 |
| 6. ЗАКЉУЧЦИ..... | 114 |
| 7. ЛИТЕРАТУРА..... | 116 |
| 8. СКРАЋЕНИЦЕ..... | 132 |

1. УВОД

1. УВОД

1.1. Одлике и развој тумора

Тумор је израз којим се означава обољење које је праћено неконтролисаним растом и ширењем абнормално измењених форми ћелија. Термин малигни тумор, карцер и малигна неоплазма су синоними под којима се подразумевају сви типови канцера, док се термин карцином односи само на канцер епителног порекла. Малигни тумори се разликују од бенигну тумора по дедиференцијацији, инвазивности и способности да метастазирају, док и бенигни и малигни тумори имају убрзану пролиферацију [1, 2].

Здрава ћелија може постати малигна услед мутација тумор супресорских гена и онкогена у својој дезоксирибонуклеинској киселини (ДНК), које могу бити стечене или наследне, јер се тумор сам по себи не наслеђује, већ мутирани гени и предиспозиција за његов развој. Развој тумора је сложен, мултифакторски процес, који укључује више генских промена и епигентске факторе (утицај хормона, ко-канцерогена, промотера и др.) који самостално нису узрок тумора, али повећавају могућност да постојеће генске мутације резултују развојем истог. Две основне групе генских промена које доводе до настанка тумора су: мутација прото-онкогена (гени који физиолошки контролишу деобу ћелије, апоптозу или диференцијацију) после које постају онкогени и инактивација гена који супримирају тумор (антионкогени). Ове промене су последица тачкастих мутација, амплификације гена или транслокације хромозома, које настају услед деловања одређених вируса или хемијских канцерогена. Неконтролисани раст (пролиферација) туморских ћелија је значајнији показатељ разлике између здраве и туморске ћелије, од саме брзине раста. Једноставно није тачно да се туморске ћелије деле брже од здравих, јер и код здравих и код туморских ћелија постоје ћелије које се брзо деле и оне које се споро деле, што зависи од типа ћелије. Неконтролисана пролиферација настала услед инактивације антионкогена или трансформације прото-онкогена у онкогене, даље узрокује поремећај функције фактора раста и њихових рецептора, сингалних путева, регулатора ћелијског циклуса (циклини, циклин зависне киназе, инхибитори циклин зависних киназа), механизма апоптозе, телемеразе [1, 3, 4, 5, 6].

Апоптоза је програмирана смрт ћелије и за развој тумора неопходне су генске мутације у анти-апоптотском систему. Односно, инактивација про-апоптотских или активација анти-апоптотских фактора доводи до снижене апоптозе, а развој резистенције на апоптозу је кључан у настанку тумора [1, 7].

Теломере су кратке понављајуће секвенце нуклеотида које се налазе на крајевима хромозома, чувајући их од разградње, измена и интеракције са другим хромозомима. Сваком деобом ћелије, теломере се скраћују и након критичног скраћивања, ћелије престају да се деле и улазе у фазу коначног мировања (енгл. *senescence*) или пак у апоптозу. Поједине ћелије - полне ћелије, матичне ћелије, ћелије костне сржи и гастроинтестиналног тракта експримирају ензим - теломеразу, који одржава дужину теломера. Диферентоване соматске ћелије не експримирају теломеразу, док око 95% тумора у каснијим стадијумима експримира, па се претпоставља да прекомерна експресија теломеразе омогућава туморским ћелијама да се неограничено репликују и тако пролиферишу, односно постану бесмртне [1, 8].

Претходно наведени подаци објашњавају процес малигне трансформације и процес настанка бесмртне ћелије, који сами по себи нису довољни за раст укупне туморске масе. Раст солидних тумора зависи од прокрвљеност микроокружења у ком се налазе. Док је тумор величине 1-2 mm он може да се исхрањује услед дифузије

хранљивих састојака из окружења, али за даљи раст неопходан је развој нових крвних судова – ангиогенеза [1, 9].

Бржем расту тумора и лошијој прогнози доприноси и степен диференцијације, слабо диферентовани тумори су прогресивнији. Инвазивност, још једна карактеристика која разликује туморску од здраве ћелије. Здраве ћелије „поштују“ границе између различитих ткива, па тако се ћелије панкреаса не могу наћи у тестисима или ћелије јетре у зиду мокраћне бешике. Уколико се догоди погрешна миграција здраве ћелије, доћи ће до њене апоптозе као резултат ускраћења анти-апоптотских фактора. Здраве ћелије мукозе стално пролиферишу, али остају на нивоу епитела црева, док карциномске ћелије мукозе ректума улазе у ткиво осталих слојева зида ректума, а могу и да продру у ткива других органа у карлици. Инвазивност туморских ћелија, није само последица интензивираних пролиферација, већ и адаптације ћелија да луче ензиме (металопротеиназе, које растварају екстрацелуларни матрикс) и молекуле који ће им омогућити да преживе и формирају удаљену метастаску нишу. Метастазе су секундарни тумори настали од ћелија које су се одвојиле од примарног тумора и доспеле до неког другог удаљеног ткива путем крвотока или лимфотока (нпр. метастазе карцинома дојке се често налазе у плућима, костима и мозгу). Метастазе су главни проблем у терапији тумора и основни су узрок високог морталитета [1, 10].

Развој и прогресија тумора нису само последица генских промена у самој ћелији, већ и промена у микроокружењу тумора које је сачињено од ендотелних ћелија, фибробласта, инфламаторних ћелија и мезенхималних матичних ћелија (енгл. *Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) [11]. Допринос MSCs патогенези тумора предмет је научних истраживања последњих година. MSCs су мултипотентне адултне ћелије, самообновљиве ћелије, сличне фибробластима, које карактерише способност диференцијације у ткива мезодермалног порекла. Најчешће се изолују из костне сржи, масног ткива, крви пупчане врпце, али се могу наћи у скоро свим постнаталним органима и ткивима. Међутим, иако су најпре привукле велику пажњу због свог потенцијалног терапијског ефекта, све више се истражује њихова улога у патогенези тумора. MSCs комуницирају са ћелијама тумора директно (кроз ћелијски контакт), али и индиректно посредством солубилних имуномодулаторних фактора као што су цитокини (анти-инфламаторни: IL-10; про-инфламаторни: IL-12, IFN- γ), хемокини (MIP-1 α и MIP-1 β , RANTES, CXCL9 и CXCL10), фактори комплемената, фактори раста (TGF- β , TNF- α), метаболити и протеолитички ензими. MSCs нису конститутивно имуносупресивне, већ само када су изложене довољно високим концентрацијама проинфламаторних цитокина [12, 13, 14, 15, 16].

Поједине студије сугеришу да MSCs инхибирају раст и метастазирање тумора, тако што промовишу инфилтрацију инфламаторних ћелија у тумор, инхибирају ангиогенезу, супримирају сигнализацију Wnt и Akt путева и индукују заустављање ћелијског циклуса и апоптозу [17, 18]. С друге стране, бројнија истраживања ипак показују да MSCs делују стимулативно на развој тумора на више начина: транзицијом до фибробласта који су потпора тумору, супримирањем имуног одговора, промоцијом ангиогенезе, стимулацијом транзиције епителних у мезенхималне ћелије, инхибицијом апоптозе туморских ћелија, променом микроокружења тумора и промоцијом метастаза тумора. Стога, улога MSCs у прогресији тумора и молекуларним механизмима још увек није у потпуности разјашњена [11].

1.2. Утицај цитостатика на ћелијске механизме тумора

Постоје три основна приступа у лечењу тумора - хируршка ексцизија, радиотерапија и хемиотерапија, и улога сваког од приступа зависи од типа и стадијума развоја тумора. Хемиотерапија се може користити самостално или као додаток неком другом облику лечења. Хемиотерапија, односно примена одређене терапијске дозе цитостатика уништава константну фракцију малигнућ ћелија, што значи да након сваке дозе цитостатика која убије чак 99,99% малигнућ ћелија, ипак преостаје неколико милиона живих малигнућ ћелија које се експоненцијално деле, стога је неопходно хемиотерапију примењивати у циклусима [1].

Међутим, основна препрека успешности хемиотерапије је чињеница да се тумори обично дијагностикују у узнапредовалом стадијуму. У почетном стадијуму развоја тумора, ћелије се деле експоненцијално, али је то време удвостручавања ћелија различито за разне туморе и може износити од неколико сати до пар месеци. Међутим, континуирано експоненцијални раст није могућ, па тако већина солидних тумора (плућа, утеруса, желуца), за разлику од леукемије, све спорије расте са порастом туморске масе. То се дешава када туморске ћелије прерасту могућност исхране тумора, што за последицу доводи до појаве некрозе тумора, а делом и због тога што не расту све ћелије тумора константно. Солидни тумори се састоје од два различита, али међусобно зависна компартмана: паренхима, чине га туморске ћелије и строме. Строма солидних тумора се састоји од везивног ткива, крвних судова и инфламаторних ћелија, и настаје као резултат интеракције туморских ћелија и здравог ткива домаћина. И док са једне стране строма омогућава раст тумора (јер сваки солидни тумор, без обзира на тип или ћелијско порекло, захтева строму уколико је већи од 1 - 2 mm), са друге стране она такође може ограничити размену течности, гасова, прилив инфламаторних ћелија или ограничити инвазивност туморских ћелија [1, 19]. Туморске ћелије ослобађају регулаторне молекуле који стимулишу ћелије строме да се размножавају и мигрирају у тумор, а ћелије строме заузврат ослобађају различите цитокине који промовишу раст тумора, његову инвазивност и резистенцију на хемиотерапију. Ћелије ова два компартмана се даље могу сврстати у три категорије. Прву категорију чине ћелије које се деле и континуирано су у ћелијском циклусу. Другој категорији припадају ћелије које су у фази мировања (*G0* фаза), али имају могућност да се деле. Трећу категорију чине ћелије које више немају могућност деобе, али доприносе величини тумора. У суштини, само ћелије прве категорије, које могу чинити само 5% неких солидних тумора, су осетљиве на примену цитостатика. Док резистенцији на примењену хемиотерапију доприносе ћелије из друге категорије, јер нису осетљиве на примену цитостатика, а ипак могу након његове примене да уђу фазу дељења [20].

Већина антитуморских лекова делује на процес ћелијске деобе, док на инвазивност, губитак диференцијације или могућност метастазирања, немају специфично инхибиторно дејство. За многе цитостатике, антипролиферативни ефекат који изазивају резултат је дејства током *S* фазе ћелијског циклуса и оштећења ДНК које узрокују, а које уводи ћелију у апоптозу [1, 3, 21].

1.2.1. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус представља специфични редослед догађаја, регулисан бројним протеинима који за резултат има деобу ћелије. Ћелијски циклус се састоји од две главне фазе: интерфазе и митозе (*M*). Интерфаза је период ћелијског циклуса између две митозе и састоји се из три фазе (*G1*, *S* и *G2*). Током *G1* фазе се обавља синтеза протеина за новонасталу ћелију, акумулира рибонуклеинска киселина (РНК), регулациони протеини и ензими за синтезу ДНК. У *S* фази се одвија репликација, тј. удвостручавање количине ДНК. *G2* фаза се налази између завршетка репликације (*S* фазе) и почетка митозе (*M* фазе) и за њено време се синтетишу протеини цитоскелета, удвостручују се центриоле и акумулира аденозин трифосфат (енгл. *Adenosine triphosphate* - АТР), односно, ћелија се припрема за митозу. Митоза се одвијају кроз више фаза (профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза) и резултује деобом ћелије на две ћерке ћелије [22].

Прелазак из *G1* у *S* фазу и из *G2* у *M* фазу су два критична догађаја у ћелијском ћиклусу која су пажљиво регулисана контролним тачкама. Уколико дође до оштећења ДНК, ћелијски циклус ће се зауставити на једној од ове две тачке. Немају све ћелије исти ћелијски циклус, док се ћелије костне сржи и гастроинтестиналног тракта деле свакодневно, поједине могу привремено (сперматогамије пре пубертета) или трајно (нервне ћелије) да буду заустављене у *G1* фази, а матичне ћелије готово цео животни век проведу у *G0* фази ћелијског циклуса [22, 23].

Напредовање ћелијског циклуса је строго контролисан процес. Како би се спречило напредовање и ширење мутираних или оштећених ћелија, контролне тачке за праћење интегритета ДНК се налазе у касној *G1* фази, односно почетку *S* фазе и на прелазу *G2* у *M* фазу. Ћелијски циклус је контролисан унутрашњим (циклини, циклин зависне киназе) и спољашњим (хормони, фактори раста, цитокини) чиниоцима, који дају сигнал ћелији и покрећу ћелијски циклус из *G0* у *G1* фазу. Спољашњи чиниоци који доводе до експресије гена за регулацију ћелијског циклуса и стимулишу брзину пролиферације, раста и ток ћелијске диференцијације су митогени [22]. Ћелија реагује на ове спољне стимулусе кроз каскаду унутарћелијске фосфорилације, регулацијом експресије циклина који остварују интеракције са циклин-зависним киназама (енгл. *Cyclin Dependent Kinases* - CDK). CDK фосфорилишу различите протеине при чему се неки од њих на тај начин активирају, а други инхибирају. Секвенцијалним функционисањем неколико различитих CDK активирају се процеси који обезбеђују напредовање ћелијског циклуса. CDK су неактивне док се за њих не вежу циклини. Активирани CDK даље фосфорилишу одређене протеине неопходне за одређену фазу ћелијског циклуса. У зависности од фазе ћелијског циклуса расте концентрација појединих циклина због њихове повећане синтезе, док опада концентрација других циклина због протеолитичке разградње помоћу убиквитин/протеазног система. На тај начин, периодична синтеза и разградња циклина обезбеђује иреверзибилност процеса и једносмерност тока ћелијског циклуса [1, 24, 25].

Постоји осам главних група циклина, од којих су циклини А, В, D и Е важни за контролу ћелијског циклуса. Сваки циклин је повезан са неком CDK и активира је. Циклин А активира CDK1 и CDK2; циклин В активира CDK1; циклин D активира CDK4 и CDK6; циклин Е активира CDK2.

Циклус започиње у *G1* фази са повећањем експресије циклина D (D1, D2, D3). Циклини D се везују за CDK4 и CDK6 на тај начин их фосфорилишу и активирају. Активирани CDK затим фосфорилишу ретинобластома протеин (енгл. *Retinoblastoma* - Rb). Rb протеин има круцијалну улогу у регулацији напредовања *G1* фазе кроз контролну тачку, јер у случају оштећења генома, циклус може бити одложен или

зауостављен. Чланови породице Rb су „депни протеини“ који интерагују са E2F транскрипционим протеинима. E2F граде комплекс са ДНК, а нефосфорилисани или хипофосфорилисани Rb се чврсто везује E2F и инхибира транскрипцију. Након што CDK4/6 фосфорилишу Rb, Rb се дисоцира од E2F, дозвољавајући E2F да транскрибује бројне одговорне гене (укључујући циклин E) потребне за пролазак кроз контролну тачку. Rb је „чувар“ циклуса, јер хипофосфорилисани Rb чува контролну тачку спречавајући напредовање ћелијског циклуса, док је хиперфосфорилација Rb повезана са ослобађањем E2F и проласком кроз контролну тачку. Rb се одржава у свом хиперфосфорилираном стању током остатка циклуса, те има улогу у вођењу ћелије кроз S, G2 и M фазе. Rb је недефосфорилисан докле год се митоза не заврши. Како ћелија напредује кроз касну G1 фазу, повећава се експресија циклина E. Комплекс - циклин E/CDK2 је неопходан за даљу прогресију циклуса, односно за прелазак из G1 у S фазу. Повећана експресија циклина A се јавља на прелазу G1/S и траје кроз S фазу. Везивањем циклина A за CDK2, наставља се синтеза ДНК. У другом делу S фазе, циклин A се везује за CDK1. Контролна тачка у G2 фази одговара на оштећење ДНК или непотпуну синтезу ДНК, тако што одлаже напредовање у митозу, како би се омогућило поправљање ДНК или се циклус зауставља. Повишен ниво комплекса - циклин A/CDK1 и циклин B/CDK1 неопходни су за улазак ћелије у митозу, односно прелазак друге контролне тачке. За разлику од циклина C, D, E који имају кратак живот, циклини A и B остају стабилни кроз међуфазу, али подлежу протеолизи таком митозе [1, 24, 25].

Ген p53 се сматра „чуваром генома“. Он кодира протеин транскрипциони фактор – протеин p53 који надгледа интегритет ћелијског генома. Ниво протеина p53 у ћелијама које се деле је низак или недетектабилан и управо одржавање овако ниског нивоа p53 омогућава да се репликација несметано настави. У присуству геномског оштећења, као што је то случај услед дејства цитостатика, протеин p53 прекида ћелијски циклус како би оставио време за поправку ДНК, што је постигнуто инхибицијом фосфорилације Rb протеина. Протеин p53 контролише ћелијски циклус кроз регулацију транскрипције инхибитора CDK (енгл. *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors* - CDKI или SKI) - p21, који је активни инхибитор CDK 4, 6 и 2. Инхибиција активности киназе спречава фосфорилацију Rb и као резултат тога, ћелија остаје у G1 фази, омогућавајући време за поправку ДНК. Када оштећење ДНК премаши капацитет ћелије за поправку, p53 уводи „неисправну“ ћелију у апоптозу индуковањем експресије про-апоптотског протеина Вах.

Две фамилије инхибитора CDK су укључене у регулацију ћелијског циклуса. Cip/Kip (енгл. *Kinase inhibitor protein* – Kip) фамилија обухвата инхибиторе p21 и p27, који делују на више места у ћелијском циклусу, везујући се за CDK 2, 4 и 6. Друга фамилија обухвата Ink4 (инхибиторе CDK4) конститутивно експримиране гене. Ген Ink4a кодира два различита транскрипта, p16^{INK4a} и p19^{ARF}. SKI p16^{INK4a} специфично инхибира CDK4 и CDK6, док се p19^{ARF} везује за MDM2 (енгл. *Murine Double-Minute 2*) протеин и блокира разградњу p53. Одговор на усходну регулацију p53, је повећање синтезе p21 које је праћено инхибицијом CDK4 и CDK6. Као резултат деловања ових SKI (p21 и Ink4 протеини), инхибира се фосфорилација Rb и ћелија се зауставља у G1 фази ћелијског циклуса [1, 24, 25].

Антипролиферативни ефекат многих класичних цитостатика резултат је дејства током S фазе ћелијског циклуса и оштећења ДНК, што резултује заустављањем ћелијског циклуса у G2 фази и последичном програмираном ћелијском смрћу – апоптозом [26].

Међутим, ћелијска пролиферација је могућа једино ако постоји интегрисана интеракција између фактора раста, екстрацелуларног матрикса и металопроотеиназа.

Екстрацелуларни матрикс луче саме ћелије под утицајем фактора раста и цитокина, док активност неких фактора раста одређује сам матрикс, пошто се ти фактори могу инактивирати у интеракцији са његовим компонентама и ослобађањем ензима (металопротеиназа) из ћелије. Главни иницијатори ћелијског циклуса су заправо фактори раста, који иницирају ослобађање металопротеиназа које разграђују локални матрикс у припреми за повећање броја ћелија. Међутим да би се ћелијска деоба неометано одвијала, неопходна је интеракција интегрина (трансмембрански протеини) са елементима екстрацелуларног матрикса (фибронектин, протеогликани, колаген). Пратећа појава ћелијске пролиферације је и ангиогенеза, која представља процес формирања нових капилара од постојећих малих крвних судова и која је стимулисана васкуларним ендотелним фактором раста (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF*) [27].

Како ћелијска пролиферација не би била могућа без интегрисане интеракције између фактора раста, екстрацелуларног матрикса, металопротеиназа и ангиогенезе, ови чиниоци су постали мета неklasичних цитостатика. Некласични цитостатици су дизајнирани са циљем да се превазиђу токсични ефекти које испољавају класични цитостатици којима је главни циљ везивање за молекуле ДНК. Док неklasични цитостатици, као што су комплекси рутенијума, антитуморско и антиметастатско дејство остварују интеракцијом са екстрацелуларним матриксом и протеинима и инхибицијом одређених фактора раста, металопротеиназа и ангиогенезе [1, 28, 27].

1.2.2. Ћелијска смрт

Ћелије могу реаговати на стрес на разне начине, од активације путева преживљавања до иницирања ћелијске смрти која елиминише оштећене ћелије. Да ли ће ћелије изложене стресу одреаговати на протективан или деструктиван начин, у великој мери зависи од природе и трајања стреса, као и од типа ћелије [29]. Једна врста хемијског стреса за ћелију је свакако цитостатик.

Апоптоза је тип ћелијске смрти који одржава хомеостазу ћелијске популације у ткивима и саставни је део развоја и старења организма. Али исто тако, апоптоза може бити и индукована разним спољашњим факторима. Стога, апоптоза представља одбрамбени механизам, у случају да је ћелија инфицирана или када су ћелије оштећене услед болести (нпр. тумор) или штетних физичких или хемијских узрочника (нпр. цитостатик). Апоптоза је програмиран и енергетски зависан процес који подразумева каскадну активацију групе цистеинских протеаза – каспаза, које повезују иницијални стимулис са коначном смрћу ћелије и налазе се у облику зимогена докле год не дође до одговарајуће активације апоптотским сигнаlima. Каспазе су подељене у три групе: иницијаторске каспазе (каспаза 2, 8, 9 и 10) које су одговорне за покретање протеолитичке каскаде, ефекторске каспазе (каспаза 3, 6 и 7) које протеолитички разлажу ћелијске супstrate и запаљенске каспазе (1, 4 и 5) [29, 26].

Морфолошке промене ћелије карактеристичне за апоптозу су смежување ћелије, интактна мембрана, кондензација хроматина (пикноза), апоптотска тела и изостанак инфламаторног одговора. Потенцијално опасни цитоплазматски ензими пажљиво се пакују и одстрањују са мембране у вакуолама званим апоптотска тела, која се брзо фагоцитишу у макрофагима, тако да не проузрокују локално оштећење [30, 31].

Апоптоза индукована применом цитостатика, одвија се кроз два главна ћелијска пута апоптозе – унутрашњег митохондријалног пута и спољашњег пута посредованог рецепторима смрти. Оба пута активирају иницијаторске каспазе и оба иду ка коначном ефекторском путу [32, 33].

Унутрашњи (митохондријални) апоптотски пут покрећу окидачи из ћелије, попут оштећене ДНК коју није могуће репарирати, као што је то случај код оштећења изазваних цитостатицима. Пермеабилizација спољне мембране митохондрије је одлучујући фактор унутрашњег пута, јер садржај митохондрија, као што је цитохром С, иницира терминалне ефекте активацијом каспазе. Контролер унутрашњег пута, Bcl-2 (енгл. *B-Cell Lymphoma-2*) је део Bcl фамилије коју карактеришу анти-апоптотске особине. Налази се на спољашњој митохондријалној мембрани и блокира про-апоптотске протеине, Bax (енгл. *Bcl-2 associated X protein*) и Bak (енгл. *Bcl-2 antagonist/killer*) како би спречио повећање пермеабилности спољашње мембране митохондрија и ослобађање садржаја унутрашње митохондријалне мембране. Инактивација Bcl-2 омогућава олигомеризацију трансмембранских протеина Bax/Bak и формирање пора, омогућавају про-апоптотским протеинима интермембранског простора да исцуре у цитоплазму. Један од тих протеина је и цитохром С који је кључни активатор извршне фазе апоптозе. Ослобођени цитохром С започиње стварање апоптозома комбиновањем са Araf-1 протеинима (енгл. *Apoptotic Protease Activating Factor-1*) у цитоплазми, који доводе до протеолитичке активације про-каспазе 9. Ћелије које носе мутацију у Bcl-2, због које се повећава количина Bcl-2 или Bax/Bak остаје инхибиран упркос сигналима смрти, могу постати канцерогене јер се одупиру апоптози [31, 34, 35, 36, 37].

Други начин на који цитостатици доводе до апоптозе је активацијом пута рецептора смрти, тако што доводе до усходне регулације рецептора смрти или пак индукују повећану експресију лиганда смрти. У ћелијској мембрани већине типова ћелија налазе се чланови фамилије рецептора фактора некрозе тумора (енгл. *Tumor Necrosis Factor Receptors - TNFR*) који функционишу као рецептори смрти, као што су TNFR-1 и CD95 (познати као Fas или Apo-1). Сваки рецептор има свој домен смрти у цитоплазми. Када лиганд смрти (FasL) ступи у интеракцију са рецептором смрти (FasR), интеракција FasR/FasL, активира се адаптерски протеин - FADD (енгл. *Fas Associated Death Domain Protein*) домен смрти. Ново формиран FADD (или домена ефектора смрти) се сада може комбиновати са про-каспазом 8 (зимоген каспазе 8). Ова фузија ствара DISC комплекс (енгл. *Death Inducing Signaling Complex - DISC*) који шаље сигнале за покретање процеса апоптозе и покреће протеолитичку хидролизу зимогена и ослобађање каспазе 8 [31, 36, 1].

Цитостатици могу довести и до некрозе ћелије услед великог оштећења ћелијске мембране и унутрашњих структура. Некроза се разликује од апоптозе првенствено по веома брзом губитку потенцијала ћелијске мембране. Услед губитка трансмембранског потенцијала унутрашње стране митохондријалне мембране нестаје протонски градијент и отварају се митохондријалне поре. Отварање пора за последицу има престанак синтезе АТФ у току оксидативне фосоријације. У ћелијама са Na^+/K^+ пумпом, недостатак довољне количине АТФ онемогућава транспорт, тако да почиње да се повећава садржај натријума у ћелији. То доводи до бубрења ћелије, јер повећање интраћелијског натријума повлачи воду унутар ћелије. Бубрење ћелије, „пенушање“ мембране и губитак микровила су типичне промене некротичне ћелије које су реверзибилне ако се АТФ обнови на време. Уколико се АТФ не обнављања, Ca^{2+} пумпа престаје да ради, што за последицу има инфлукс јона калцијума и повећање нивоа унутарћелијског слободног калцијума. Слободни калцијум је активатор многих ћелијских процеса, стога почиње да ступа у интеракцију са ћелијским ензимима који узрокују даље оштећење мембране и једра ћелије [31, 38]. Слободни цитоплазматски калцијум повећава пермеабилност митохондрија, повећавајући ослобађање цитохрома С, који даље започиње каскадно оштећења ћелије директном активацијом каспаза. Ово је један од путева где се некроза и апоптоза преклапају, јер је активација каспазе

примарни механизам апоптотске смрти, који је сврсисходно регулисан низом фактора, док је код некротичне ћелијске смрти ослобађање каспаза изазвано случајно услед ћелијског оштећења. Некрозу још карактерише дезинтеграција ћелијске мембране и неконтролисано ослобађање цитоплазматског садржаја у окружење, што изазива инфламаторни одговор околног ткива [31, 39].

1.2.3. Иmunски одговор

Иmunски систем има битну улогу у превенцији, развоју и расту тумора. Још давне 1969. године, *Barnett Rosenberg* је указивао на то да би ефекти цисплатине на имунске процесе могли бити у основи њене селективности према тумору [40]. У то време он је сматрао да би цисплатина могла променити имуногеност ћелија тумора уклањањем имуносупресивних молекула са њихове површине. Међутим, ипак постоји разлика у начину интеракције између различитих једињења платине (цисплатине, карбоплатине и оксалиплатине) и имунског система. На пример оксалиплатина је активна против мишијег карцинома колона (модел алогофта) само када се карцином индукује код имунокомпетентних мишева, док је потпуно неактивна уколико се карцином индукује мишевима са тешком комбинованом имунодефицијенцијом или мишевима којима недостају Т ћелије [41, 42].

Док је цисплатина активана у оба модела, али је и њен антитуморски потенцијал значајно редукован када се примени код карцинома колона индукованог имунодефицијентним мишевима [43].

Иако је добро познато да хемиотерапеутици испољавају мијелосупресивно дејство, све је више преклиничких и клиничких истраживања која указују на то да хемиотерапеутици чак могу да стимулишу ћелије имунског система да препознају туморске ћелије и на тај начин побољшају њихов антитуморски ефекат [44].

Током онкогенезе туморски антигени се генеришу услед генских мутација и прекомерне експресије одређених гена, као и измењених пост-транскрипционих и пост-транслационих модификација. Стога туморске ћелије експримирају специфичне антигене које ћелије имунског система могу да препознају као стране и елиминишу их. Али туморске ћелије имају и механизме помоћу којих успевају да избегну имунски одговор и наставе да неометано пролиферишу [45, 46, 47].

Иmunски систем се састоји од међусобно повезаних урођених и стечених механизма. Урођени систем чине гранулоцити мијелоидне лозе (неутрофили, базофили, еозинофили), мастоцити, моноцити, макрофаги и дендритске ћелије (енгл. *Dendritic Cells* - DC), као и ћелије лимфоидне лозе - ћелије природне убице (енгл. *Natural Killer* - NK) које брзо уклањају патогене, делује на неспецифичан начин и са ограниченим развојем имунске меморије (меморијске NK ћелије). Урођени имунитет је повезан са стеченим имунским одговором, омогућавајући специфично и перзистентно имунско памћење. Ћелије стеченог имунског система (Т и В лимфоцити) потичу из лимфоидне лозе хематопоетског система и имају велики капацитет за откривање туморских антигена [48].

Ћелије урођеног имунитета (NK ћелије, макрофаги, неутрофили и DC) прве долазе у контакт са (пре)малигним ћелијама, међу њима NK ћелије имају централну улогу у имунском надзору организма и одбрани од малигно трансформисаних ћелија. Везивање NK ћелија за главни комплекс хистокompatбилности (енгл. *Major Histocompatibility Complex* - MHC) класе I одвија се преко различитих инхибиторних рецептора, на пример, преко KIR и NKG2 рецептора из фамилије рецептора који сигнализирају NK ћелијама да остану инактивне [49, 50].

Малигна трансформација често резултује сниженом експресијом МНС класе I на површини ћелије, па тако туморске ћелије избегавају имунски надзор NK ћелија. Међутим, NK ћелија се активира када наиђе на циљне ћелије којима недостаје МНС класе I. С једне стране, активирани NK ћелије настављају да убијају циљне (туморске) ћелије путем апоптозе која је посредована рецепторима смрти (FasL и TRAIL), као и путем перфорације плазматске мембране посредоване перфорином и гранзимом B. С друге стране, смањено везивање NK ћелија за МНС класе I чини их осетљивијим на активацију низом активационих рецептора (NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D, NKG2C, DNAM-1, NTB-A, NKp80, CD59 и CD16) који препознају сигнале стреса експримиране на туморским ћелијама [51].

Металофармацеутици доводе до усходне регулације активационих рецептора NK ћелија (NKG2D, NKp30 и DNAM-1), који препознају лиганде (MICA/MICB, ULBP1-3, CD112, CD155 и B7-H6) које експримирају туморске ћелије. Повећава се експресија NKG2D на NK ћелијама, али и на NKT ћелијама и цитотоксичним CD8⁺ Т лимфоцитима. Металофармацеутици доводе до усходне регулације NKG2D и DNAM-1 лиганда на ћелијама тумора, директно - услед оштећења ДНК или индиректно - посредством повећане производње реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species* - ROS). Овакав ефекат металофармацеутика на ћелије тумора омогућава бољу активацију ћелија урођеног и стеченог имунитета. Поред тога, DC, NK ћелије, неутрофили и макрофаги препознају молекулске обрасце оштећених ћелија (енгл. *Damage-Associated Molecular Pattern* - DAMP), укључујући HMBG1 и протеине топлотног шока (HSP70, HSP90) на површини туморских ћелија и на тај начин у потпуности активирају цитотоксичност NK ћелија. Металофармацеутици додатно подржавају препознавање туморских ћелија од стране NK ћелија услед усходне регулације DAMP на површини туморских ћелија који интерагују са TLR и RAGE рецепторима на NK ћелијама [52, 53].

1.2.4. Оксидациони статус

Генерисање, трансформација и потрошња органских молекула су основа ћелијске диференцијације, раста и одржавања у животу. У патофизиолошким условима као што је развој тумора долази до дисбаланса између производње оксиданаса и потрошње антиоксиданаса што доводи до појаве оксидационог стреса. Потрошња кисеоника у митохондријама игра централну улогу у овим процесима, јер оне представљају својеврстан биохемијски, респираторни и енергетски систем. Током процеса оксидативне фосфорилације, митохондрије користе кисеоник за генерисање АТФ из органских молекула који служе као извор енергије, али у том процесу такође стварају ROS [54]. У ROS генерисане унутар митохондрија сврставају се: синглетни кисеоник ($^1\text{O}_2$), супероксид ањон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), водоник пероксид (H_2O_2), азот моноксид радикал (NO^{\cdot}), хидроксил радикал (OH^{\cdot}) и хидроксил ањон (OH^-) [55].

Оксидациони стрес индукован применом цитостатика доводи до оштећења ћелије на три начина: липидном пероксидацијом мембрана, оксидативном модификацијом протеина и оштећењем ДНК. Липиди се могу оксидовати ROS иницијаторима, нарочито хидроксилним и перхидроксилним радикалима, стварајући воду и липидне радикале, чиме се иницира реакција липидне пероксидације која доводи до оштећења ћелијске мембране и осталих липидних структура ћелије. Главни интермедијарни производи липидне пероксидације су липидни хидропероксиди, а секундарни производи су токсични и мутагени алдехиди, малондиалдехид (енгл. *malondialdehyde* - MDA) и 4-хидроксиноненал (*4-hydroxynonenal* - HNE), који се

сматрају маркерима оксидационог стреса. Електрично неутрална структура алдехида им омогућава лако кретање кроз мембране и цитосол и сходно томе омогућава далекосежне штетне ефекте унутар или изван ћелија. Доказано је да HNE и MDA модификују аминокиселине и тиме доводе до оштећења протеина, као и да стварају ковалентне производе са нуклеинским киселинама и мембранским липидима. Чињеница да се ћелијска мембрана претежно састоји од полинезасићених масних киселина, чини ћелије јако осетљивим на процес пероксидације. Оксидација фосфолипида у унутрашњој мембрани митохондрија доводи до инхибиције раста ћелија и може покренути митохондријални пут апоптозе [55, 56].

Неутрализација слободних радикала и спречавање унутарћелијског оштећења, услед дејства ROS, постижу се различитим ћелијским одбрамбеним механизмима. Антиоксидациони систем заштите је један од њих и подразумева ензимске и неензимске антиоксидансе. У липидима доминантну улогу антиоксиданаса имају витамин Е, каротени, окси-каротеноиди и витамин А, док у воденој фази ту улогу имају витамин С и глутатион (GSH). Поред ових антиоксидационих молекула мале молекулске масе, значајни чланови система антиоксидационе заштите су ензимске природе - супероксид дисмутаза (енгл. *Superoxide Dismutase* – SOD), каталаза (енгл. *Catalase* – CAT) и глутатион пероксидаза (енгл. *Glutathione Peroxidase* - GPx) [57].

Супероксид дисмутаза је први међу ензимима за детоксикацију и најснажнији антиоксиданс у ћелији. Представља важан ендогени ензимски антиоксиданс који делује као компонента прве линије одбрамбеног система против ROS. Катализује дисмутацију два молекула супероксид анјона (O_2^-) до водоник пероксида (H_2O_2) и молекуларног кисеоника (O_2), што последично чини потенцијално штетни супероксид анјон мање опасним. SOD је металоензим и за његову активност је неопходан кофактор у виду јона метала (Fe, Zn, Cu и Mn) [58, 59]. Корелација између дефицита SOD и бројних патолошких стања запажена је код људи као и код животиња [60].

Каталаза је антиоксидациони ензим присутан готово у свим ткивима која користе кисеоник. Овај ензим користи Fe или Mn као кофакторе и катализује разградњу или редукцију H_2O_2 до воде и молекуларног кисеоника, довршавајући процес детоксикације који је започео SOD. CAT је високо ефикасан ензим који разграђује велики број молекула H_2O_2 у једној секунди. Ензим се налази првенствено у пероксизомима и није присутан у митохондријама ћелија сисара. Једини изузетак су митохондрије присутне у срцу пацова [61]. С обзиром на ову чињеницу, редукција H_2O_2 до воде у митохондријама ћелија сисара се одвија посредством GPx. Водоник пероксид у малим количинама има тенденцију да регулише неке физиолошке процесе, попут сигнализације у ћелијској пролиферацији, ћелијске смрти, метаболизма угљених хидрата, функцију митохондрија, активирање тромбоцита и одржавање нормалног нивоа тиола, али у високим концентрацијама постаје токсичан за ћелије [62]. Недостатак или мутација CAT повезана је са разним болестима, запажено да људи са ниским нивоом CAT су предиспонирани за развој тумора [63, 64].

Глутатион пероксидаза (GPx) је саставни део глутатион антиоксидационог система чији су чланови, поред GPx, глутатион S-трансфераза (енгл. *Glutathione S-transferase* - GST), глутатион редуктаза (енгл. *Glutathione Reductase* - GR) и GSH. GSH је ендогени неензимски антиоксиданс, који пружа заштиту од оксидационог стреса индукованог цитостатицима. GST катализује коњугацију GSH са цитостатицима и другим токсичним једињењима укључујући оксидационе интермедијере (хидропероксида и алдехиде), чинећи их тако мање токсичним и олакшавајући њихово уклањање из ћелија [65, 66].

GPx катализује редукцију хидропероксида, укључујући липидне хидропероксида до воде и одговарајућих стабилних алкохола користећи GSH као супстрат, што

резултује оксидацијом GSH до глутатион дисулфид (GSSG), који се посредвом GR претвара у редуктовани облик - GSH. Померање односа GSH/GSSG ка оксидованом стању као одговор на различите унутар- и ванћелијске услове окружења заузврат активира неколико сигналних путева који смањују пролиферацију ћелија и повећавају апоптозу [67]. GPx је важан унутарћелијски ензим који преводи H_2O_2 до воде и липидне пероксидазе до одговарајућих алкохола превасходно у митохондријама, али и у цитосолу [68]. Његова активност зависи од кофактора - селена. Ензим GPx има кључнију улогу у инхибирању процеса пероксидације липида, па стога штити ћелије од оксидационог стреса. Постоји најмање осам GPx ензима код људи, GPx1–GPx8 [69]. GPx1 је укључена у развој али и превенцију многих болести, укључујући тумор, док је GPx4 је једина глутатион пероксидаза која разграђује фосфолипидне хидропероксидазе и има митохондријску изоформу која посредује апоптотски одговор на оксидациони стрес [70]. Особе са нижом активношћу GPx су предиспонирани за ослабљену антиоксидациону заштиту, што доводи до оксидационог оштећења масних киселина мембране и функционалних протеина [71].

Примена цитостатика дефакто индукује оксидациони стрес, и то може имати добру и лошу страну. Добра је да оксидациони стрес успорава раст тумора тако што смањује брзину ћелијске пролиферације. То постиже инхибицијом преласка ћелија из *G0* у *G1* фазу, продужавајући *G1* фазу; успоравајући прогресију кроз *S* фазу, инхибирањем ДНК синтезе и инхибирањем напредовања ћелијског циклуса кроз рестрикциону тачку, што резултује заустављањем ћелијског циклуса и увођењем ћелије у апоптозу. А лоша, да оксидациони стрес индукован применом цитостатика доводи до разних нежељених и токсичних дејстава која понекад ограничавају њихову примену [56].

1.3. Металофармацеутици

Након историјског открића биолошке активности цисплатине, антитуморски потенцијал комплекса прелазних метала (металофармацеутика) је у потпуности реализован и истражен тек седамдесетих година двадесетог века [72].

Цисплатина је прототип антитуморских металофармацеутика и најефикаснији је у лечењу солидних карцинома (јајника, главе и врата, бешике, грлића материце и лимфома). Клиничка употреба цисплатине је ограничена дозно-зависним нежељеним ефектима, резистенцијом и системском токсичношћу (нефротоксичност, хепатотоксичност, неуротоксичност, кардиотоксичност) [72]. Резистенција, тј. неосетљивост туморских ћелија на примену цисплатине је последица различитих одбрамбених механизма ћелије тумора, који спречавају везивање цисплатине за ДНК. Резистенцији доприноси смањена акумулација цисплатине у ћелији услед редукованог уноса и појачаног избацавања из ћелије путем мембранских транспортних протеина. Након уласка цисплатине у ћелију, одвија се њена биоактивација (одлазећи хлоро лиганди се измењују са молекулима воде), при чему настали електрофилни, моно- или биаква-комплекси формирају ковалентну везу са S-донорима (метионин, пептиди и полипептиди који садрже цистеин, редуковани глутатион - GSH, металотионеине), што резултује инактивацијом цисплатине. Комбинација ових механизма доводи до тога да <5% примењеног лека доспе до циљног места дејства, а с обзиром на то да је терапијски опсег цисплатине узак, резистенција се не може превазићи повећањем дозе. Када се цисплатина ковалентно веже за ДНК и настану ДНК адукти, ћелије морају да уклоне или пак могу да толеришу настале промене како би се одупрле ефектима лечења, стога ензими чија је улога да репарирају настале ДНК адукте имају значајну улогу у настанку резистенције на примењену терапију [73, 74, 75, 76, 77].

Како би се превазишла резистенција и нежељена дејства која се јављају услед терапијске примене цисплатине, спроведена је синтеза и испитивање бројних аналога цисплатине. На основу резултата ових истраживања изведени су терапијски значајни комплекси платине - карбоплатина и оксалиплатина, док су недаплатина, лобаплатина и хептаплатина одобрени за клиничку употребу у Јапану, Кини и Кореји [73, 78, 79].

Други најчешће коришћени металофармацеутик, оксалиплатина, је 2002. године одобрена за лечење III фазе колоректалног карцинома након ресекције примарног тумора и за лечење метастатског колоректалног карцинома у комбинацији са 5-флуороурацилом и леуковорином. Предности оксалиплатине у односу на цисплатину су што има бољи сигурносни профил, може да се примењује *per os* и не развија унакрсну резистенцију са цисплатином. Међутим, њена примена је праћена нежељеним ефектима на нервни систем у виду периферне сензорне неуропатије и токсичним дејством на јетру, које се манифестује повишеним вредностима серумске аспартат аминотрансферазе, аланин аминотрансферазе и билирубина [80, 81].

Даља стратегија развоја нових металофармацеутика, потенцијалних цитостатика, усмерена је на дизајн и синтезу комплекса прелазних метала (не само платине) и проучавање ћелијског одговора у односу на њихову примену (Табела 1.) Током последње четири деценије велики број комплекса прелазних метала ($Pt^{II/IV}$, $Ru^{II/III}$, $Au^{I/III}$, Ti^{IV} , $Ir^{I/III}$, Os^{II} , $Cu^{II/III}$) детаљно је испитиван у *in vitro* и *in vivo* експериментима, а неки од њих и у различитим фазама клиничких студија [79, 82]. Циљ овакве стратегије није само утврђивање њихове антитуморске активности него и постизање снижене токсичности, превазилажење резистенције и шири спектар дејства.

Табела 1. Механизми ћелијске смрти изазване комплексима прелазних метала [82, 83].

| | |
|--|--|
| Формирање адуката ДНК | Ir^{III} , Cu^{II} , Ru^{III} , Au^{I} , Co^{II} , Pt^{II} , Ti^{IV} , Os^{II} |
| Дисфункција цитохрома С | Ir^{I} , Pt^{II} , Ru^{II} |
| Деполаризација мембране | Cu^{II} , Ru^{II} , Ag^{I} , |
| Заустављање/одлагање ћелијског циклуса | Ru^{II}/ Ru^{III} , Pt^{II} , V^{IV} , Cu^{II} , Co^{II} |
| Стварање ROS | $\text{Cu}^{\text{I/II}}$, $\text{Ir}^{\text{I/III}}$, Ru^{II} , $\text{Pt}^{\text{II/III}}$, $\text{Cu}^{\text{II/III}}$, |
| Везивање за протеине и инхибиција протеина | $\text{Au}^{\text{I/III}}$, Cu^{II} , Co^{II} , Ir^{III} , Pt^{II} , Ru^{II} |
| Стрес ендоплазматског ретикулума | Ir^{III} , Pt^{II} , Ru^{II} |

1.3.1. Комплекси рутенијума као потенцијални металофармацеутици

Рутенијум припада VIIIб групи периодног система елемената, као и родијум, паладијум, осмијум, иридијум и платина, који уједно чине платинску групу метала [83]. Велики број комплексних једињења елемената платинске групе метала поседује антибактеријска, антипаразитска и антитуморска својства због чега су ова једињења нашла примену у медицини [84].

Биолошку активност, укључујући и антитуморску активност комплекса рутенијума, први су препознали *Dwyer* и његови сарадници 1950-их година [85]. Последњих година су синтетисана бројна једињења рутенијума и окарактерисане њихове антипролиферативне активности и механизми деловања против неколико типова тумора. Међу првим испитиваним комплексима рутенијума у погледу цитотоксичног дејства су хлоро-амино рутенијум(III) комплекси који су структурно били инспирисани цисплатином и сматрало се да им је дејство засновано превасходно на везивању за молекуле ДНК. И поред доказане цитотоксичности, ови рутенијум(III)-хлоро-амино комплекси, *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ (**Схема 1**) и *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ (**Схема 1б**) су имали ограничења за *in vivo* примену због своје електронеутралности и слабе растворљивости у води. Између осталих рутенијум-аминских комплекса тестираних на цитотоксичност према ћелијским линијама карцинома се нашла и позната цитолошка боја, рутенијум црвено $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_4-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]$ (**Схема 1в**) за коју се сматра да инхибира транспорт Ca^{2+} у ћелије селективним везивањем за Ca^{2+} -транспортне протеине [85].

У циљу превазилажења наведених недостатака, *Sava* и сарадници су дизајнирали рутенијум(II)-хлоридо комплексе са диметилсулфоксидом (енгл. *dimethyl sulfoxide* - DMSO) као лигандом, који су били растворљивији у води. При чему је *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dmsO})_4]$ геометријски изомер био 20 пута активнији од *cis* изомера и показао мању активност према примарном тумору, али већу селективност и ефикасност према метастазама. Ова чињеница је указала на разлику у механизму дејства рутенијумских комплекса у односу на *cis* и *trans* комплексе платине, што се делимично може објаснити разликом у координационој геометрији, јер су рутенијум(II) комплекси октаедарске структуре, док је цисплатина квадри-планарне [85].

Значајније откриће по питању рутенијумских комплекса догодило се 1986. године, када је *Keppler* са својим сарадницима по први пут објавио антитуморску активност ањонског комплекса рутенијума(III), растворљивог у води, $(\text{imH})[\text{trans}-\text{RuCl}_4(\text{im})_2]$ (имидазол - im), касније означен као *KP418* (**Схема 1г**) [86]. Ефекат

инхибиције раста тумора био је упоредив или бољи од учинка циклофосфамида, цисплатине или 5-флуороурацила који су се користили као референтна једињења. Годину дана касније, *Kepler* и сарадници су објавили да *KP418* испољава значајну ефикасност против раста колоректалног аденокарцинома пацова [87]. Касније је синтетисан *KP1019*, [Hind]*trans*-[RuCl₄(ind)₂], (Схема 1д), стабилан рутенијум(III) комплекс који садржи два индазола (ind) координована за централни метални јон рутенијума(III) преко атома азота у аксијалном положају. Он је инхибирао раст тумора за 90%, уз мање изражену токсичност [88], при чему је коришћен модел тумора који добро осликава хумани тумор и који није осетљив на антинеопластичне агенсе који се користе у клиничкој пракси, укључујући цисплатину, са изузетком комбиноване терапије 5-флуороурацила/леуковорина, која је показала умерену активност. *KP1019* је умерено растворљив у води, у којој на собној температури долази до споре размене једног хлоридног лиганда за молекулу воде. Хидролиза *KP1019* комплекса се убрзава са повећањем рН раствора, али је и даље довољно стабилан за примену путем инфузије [89]. Настали моноаква комплекси се транспортују посредством албумина и трансферина. Ради повећања растворљивости у води, *KP1019* је преведен у натријумову со - *KP1339* [Na(*trans*-RuCl₄(ind)₂)], (Схема 1ђ), који се тренутно користи у клиничким студијама [90]. *KP1019* је умерено цитотоксичан *in vitro*, са IC₅₀ 50–180 μM, које су нешто ниже у поређењу са вредностима IC₅₀ које су карактеристичне за његову натријумову со *KP1339*. Значајна корелација профила цитотоксичности указује на то да деле сличан начин деловања, а ни за један ни за други комплекс није пронађена корелација између укупног уноса лека у ћелију и цитотоксичности [90]. *KP1019* је испољио изузетну ефикасност у смањењу волумена колоректалног карцинома пацова и мишева (до 95%), али без антиметастатске активности [91]. Прва фаза клиничких испитивања за *KP1019* отпочела је 2003. године, у којој је *KP1019* апликован интравенски и при чему је испољио благу токсичност [92]. Међутим, због ниске растворљивости *KP1019*, даља испитивања су спроведена са боље растворљивим дериватом натријума - *KP1339* [93]. Примена *KP1339* је била праћена умереном мучнином и повећањем нивоа креатинина при највишој дози [94]. Недавно (2017. године) су објављени резултати прве фазе клиничке студије спроведене у САД у којој је испитиван *KP1339*, где се показао као безбедан и добро подношљив [95]. *KP1339* комплекс је показао умерену антитуморску активност уз претпоставку да му се механизам дејства заснива на циљању ендоплазматског шаперона, протеина GRP78, чији је ниво вишеструко повећан у неколико карцинома као одговор на стрес, те смањење нивоа GRP78 доводи до апоптозе туморских ћелија [91].

Истовремено са открићем *KP1019*, *Sava* са својим сарадницима је у истраживању на солидним метастатским туморима код мишева доказао да једињења опште формуле Na[*trans*-RuCl₄(dmsо-S)(L)] (где је L = NH₃, азол или пиридин), као и мање растворљиви неутрални деривати формуле, *mer*-RuCl₃(dmsо)₂(L), изазивају изузетно смањење формирања метастаза у плућима, док нису имали значајнији утицај на смањење раста примарног тумора [96, 97]. Даља истраживања су настављена са комплексом који у својој структури садржи имидазол и који је растворљив у води Na[*trans*-RuCl₄(im)(dmsо-S)] – *NAMI*, (Схема 1е), који је касније замењен одговарајућом соли имидазолијума, [Him]*trans*-[RuCl₄(im)(dmsо-S)], названом *NAMI-A* (Схема 1ж).

NAMI-A је тестиран на мишевима [96, 97] на којима је показано да спречава развој и раст метастаза у плућима и мозгу у више модела тумора [98, 99, 100]. Смањење броја (40-100%) и тежине (70-100%) метастаза довело је до значајног продужења времена преживљавања лечених мишева, па чак и до излечења у комбинацији са хируршким уклањањем примарног тумора [101]. Иако је *NAMI-A* показао селективност према метастазама, није примећена значајнија инхибиција раста примарног тумора, што

се не може приписати фармакокинетици комплекса, јер су концентрације рутенијума након интраперитонеалне примене биле око 2-3 пута више у плућима, јетри и бубрезима него у тумору [102]. Чак и након директне инјекције *NAMI-A* у масу тумора, смањење раста примарног тумора је било умерено, иако је концентрација рутенијума у тумору била виша него у плућима (где је концентрација била слична оној након интраперитонеалне примене) [101, 103]. Такође је утврђено да је снижење нивоа рутенијума из плућа, јетре и бубрега спорије него из примарног тумор, што указује на јаче везивање у тим ткивима [103]. Механизам дејства *NAMI-A* је вишеструк и подразумева интеракцију са ћелијом на више нивоа, укључујући: интеракцију са колагеном из екстрацелуларног матрикса и инхибицију матрикс металопротеиназа -2 и -9, затим активацију адхезионих молекула - попут β -интегрина, интеракцију са актинима, заустављање у *G2/M* фази ћелијског циклуса ћелије и везивање за нуклеинске киселине - показујући директни ефект на ДНК туморских ћелија. *NAMI-A* доводи до редукване мобилности инвазивних ћелија карцинома независно од типа тумора или клиничког стадијума болести, те је способан не само да превенира формирање метастаза већ и да инхибира њихов раст када су већ успостављене [85]. *NAMI-A* је први рутенијумски комплекс који је ушао у фазу клиничких испитивања 1999. године, као антитуморски кандидат против разних метастатских солидних тумора (колоректалног, плућа, оваријума, панкреаса) и меланома. Прва фаза клиничке студије је спроведена на Националном институту за карциноме у Амстердаму [104]. Примена *NAMI-A* је била праћена значајном мучнином, повраћањем, дијарејом и благом реверзибилном нефротоксичношћу при највишим примењиваним дозама. Иначе, профил токсичности *NAMI-A* је другачији од оног који се јавља код лекова на бази платине. Рутенијум се у крви у великој мери налазио везан за протеине, што је за последицу имало дуже задржавање рутенијума у телу, него што се очекивало из претклиничких студија [105]. Због примећене стабилизације болести код тешких пацијената са узнапредовалим немикроцелуларним карциномом плућа предложена је друга фаза клиничке студије, која је спроведена у периоду од 2008-2011. године. Међутим, због јаке мучнине, повраћања и дијареје које је изазивао, третман са *NAMI-A* је проглашен недовољно ефикасним за даљу употребу [106], тако да даља испитивања нису спроведена [91, 107].

Интересантно је да ни комплекси *KP*-типа, ни *NAMI-A* нису прошли кроз уобичајени скрининг *in vitro* цитотоксичности према ћелијским линијама карцинома, него су одмах испитивани на анималним моделима болести. Овај поступак је био од пресудне важности за њихов даљи развој, јер ниједан од комплекса рутенијума(III) није нарочито цитотоксичан *in vitro* [91].

Мотивација за развој стабилних рутенијум(II) комплекса је била хипотеза о активацији редукцијом. Многи рутенијум(II) комплекси су показала бољу антитуморску активност *in vivo* од одговарајућих рутенијум(III) аналога [107]. Најбројнија група цитотоксичних рутенијумских комплекса је група рутенијум(II) аренских комплекса, која је резултат истраживања научника *Dyson*-а и *Sadler*-а [72].

Органометалне комплексе рутенијума(II) опште формуле $[(\eta^6\text{-арен})\text{Ru}(\text{XY})\text{Z}]$, где је XY бидентатни хелатирајући лиганд, а Z је лако одлазећа група најчеће Cl , синтетисала је група сарадника научника *Sadler*-а. Утврђено је да са повећањем величине координисаног арена повећава се и активност комплекса. Промена хелирајућег лиганда у овим комплексима има велики утицај на њихову кинетику и селективност према нуклеинским базама. Сматра се да је настајање аква комплекса *in vivo* у великој мери супримирано у интрацелуларним течностима где је концентрације хлорида висока (100 mM), док у ћелијском једру, где је концентрација хлорида нижа (4 mM), комплекс формира претежно активне аква комплексе. Активни аква комплекси

настају када дође до хидролизе једног или оба хлоридо лиганда, након чега они бивају замењени молекулом воде и као такви интерагују са молекулом ДНК. Представник ове групе је $RM175$ [$(\eta^6\text{-bifenil})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, (Схема 1з). $RM175$ представља пример да је увођењем ароматичних лиганда и грађењем π -комплекса могуће превазићи резистенцију која се јавља у току терапије цисплатином, јер се осим координативног везивања за молекул ДНК преко N7-атом гуанина, ароматични лиганди интеркалацијом инкорпорирају између базних парова у молекулу ДНК и на тај начин доприносе њеном већем оштећењу. Интеркалација представља ароматичну интеракцију која се одвија када се ароматични систем (циклус) молекула лека "уметне" између ароматичних циклуса базних парова ДНК ћелије карцинома. Другим речима, представља хидрофобне интеракције између ароматичних циклуса молекула лека и ДНК-база. Интеркалација доводи до повећања растојања између суседних базних парова, што проузрокује дисторзију хеликса и ометање транскрипције и репликације ДНК. Након кратког излагања ћелија колоректалног карцинома $RM175$ комплексу, долази до његовог везивања за ДНК и последичне апоптозе ћелија услед измене p53-p21-Вах пута [83, 84].

Група органометалних рутенијум(II) комплекса која садржи 1,3,5-триаза-7-фосфоадаммантан лиганд (енгл. 1,3,5-*triaz-a-7-phosphaadamantane* – pta) је показала умерену *in vitro* активност и врло мали утицај на здраве ћелије чак и у милимоларној концентрацији. Једињења са pta лигандом испољавају малу активност према примарним туморима *in vivo*, док имају одређени капацитет да редукују плућне метастазе настале из ксенографта карцинома дојке миша. Прототип ове групе је $RAPTA\text{-}C$, [$\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(\text{pta})$], (Схема 1и), који оштећује ДНК у зависности од рН, што се сматра последицом протоновања pta лиганда, чиме се ово једињење преводи у активнији облик. С обзиром да је рН здравих ћелија неутрална, а у ћелијама карцинома због хипоксичних услова, знатно нижа, што указује на могући механизам помоћу којег $RAPTA\text{-}C$ може да испољи селективност према ћелијама карцинома. $RAPTA\text{-}C$ смањује густину микроваскулатуре, што указује на антиангиогенти механизам, којим доводи до инхибиције раста тумора. Управо захваљујући овом механизму дејства, $RAPTA\text{-}C$ је на моделу карцинома колоне постигао 50% инхибиције раста тумора у дози од 100 mg/kg/дан, интраперитонеалном инјекцијом, уз добру подношљивост, без значајног губитка масе и без озбиљних нуспојава до краја примене третмана. $RAPTA\text{-}C$ је показао ефикасну антиметастатску активност упоредиву са $NAMI\text{-}A$ и бољу фармакокинетичку са бржим клиренсом након примене [108, 109, 83].

Lakomska и сарадници су развили два рутенијум(III) комплекса која у својој структури имају триазолопиримидин као лиганде (Схема 1ј,к). Увођењем волуминознијих супституената у хетероцикличне лиганде, цитотоксичност оба комплекса је значајно побољшана, што се огледа у знатно нижим вредностима IC_{50} у поређењу са цисплатином и много бољем цитотоксичном ефекту према ћелијским линијама хуманог карцинома плућа и дојке. Сматра се да је висока цитотоксичност ових комплекса у директној спрези са њиховом високом липофилношћу, која олакшава пролазак кроз ћелијску мембрану [79].

Рутенијум(II) аренски комплекси који садрже јод и фенилазопиридинске лиганде (Схема 1л) су инертни према супституцији лиганда у воденом раствору, али су изузетно токсични по хумане ћелије карцинома јајника и плућа. Токсичност ових комплекса се може приписати њиховој способности да делују као катализатори оксидације глутатиона (GSH) кисеоником, што доводи до повећаног стварања ROS и последичне ћелијске смрти путем апоптозе. За оксидацију GSH довољне су микроларне концентрације ових комплекса рутенијума. По сличном принципу делују

органометални арена комплекси рутенијума који садрже тиолато лиганде (**Схема 1љ**) [83, 85].

Pierroz и сарадници су синтетисали серију рутенијум(II) полипиридил комплекса која су координатно засићени и субституционо инертни (**Схема 1м**). Ови комплекси имају вредности IC_{50} компарабилне са цисплатином против неколико различитих ћелијских линија карцинома и чак бољу активност према ћелијским линијама резистентним на цисплатину. Ови комплекси циљају митохондрије карциномских ћелија и индукују митохондријално посредовану апоптозу [79].

Li и сарадници су синтетисали серију рутенијум(II) комплекса који садрже деривате бис-бензимидазола као лиганде (**Схема 1н**). Ови комплекси су испитани против низа туморских ћелијских линија и нормалне ћелијске линије хуманих фибробласта (*HS68*), при чему су испољили селективну цитотоксичност против ћелија тумора и веома малу токсичности ка нормалним ћелијама фибробласта. Механизам дејства им се заснива на индукцији каспаза-зависне апоптозе карциномских ћелијама посредством хиперпродукције супероксида [79].

Meggers и сарадници су дизајнирали и синтетисали органометалне комплексе рутенијума који опонашају стауроспорин (изолован из бактерије *Streptomyces staurosporeus*) - потентан инхибитор протеин киназа. Инхибитори протеин киназа на бази метала су изведени тако што је угљено-хидратна јединица стауроспорина замењена фрагментом који садржи двовалентни јон рутенијума (**Схема 1њ**). На овај начин је развијен инхибитор гликогенске синтаза киназе 3β - *DW1/2*, који индукује апоптозу ћелија меланома [72].

Qian и сарадници су открили да рутенијум(II) комплекси који садрже фенантролин као лиганд (**Схема 1о**), испољавају активност према разноврсним ћелијским линијама тумора. Механизам дејства им се заснива на акумулирању у митохондријама и следственој индукцији апоптозе преко митохондријалног пута, који укључује продукцију ROS, деполаризацију митохондријалне мембране и активацију чланова каспаза фамилије [79].

Цитотоксичност комплекса рутенијума са арил-азо-пиридинским (*azpy*) лигандима, директно је зависна од структуре. Три од пет могућих изомера $[Ru(azpy)_2Cl_2]$ (α , β и γ) је окарактерисано, при чему њихова активност опада од $\gamma > \alpha > \beta$ изоформи у складу са њиховом способношћу да се интеркалирају у молекул ДНК. Поред ових, синтетисано је још неколико изомерних облика мултинуклеарних комплекса рутенијума са *azpy* лигандима, од којих γ/γ изомерни облик поседује највишу цитотоксичност, чак 30 пута већу од цисплатине према ћелијама карцинома дојке [83].

Рутенијум(II) полипиридил комплекс - *TLD1443* има добру терапијску ефикасност код карцинома бешике и тренутно је у II фази клиничких испитивања (**Схема 1п**), [107].

На основу до сада познатих и доступних резултата истраживања, може се рећи да комплекси рутенијума имају велики потенцијал за употребу у терапији карцинома, с обзиром на то да су једини комплекси, поред комплекса платине, који се испитују у неким фазама клиничких студија [107].

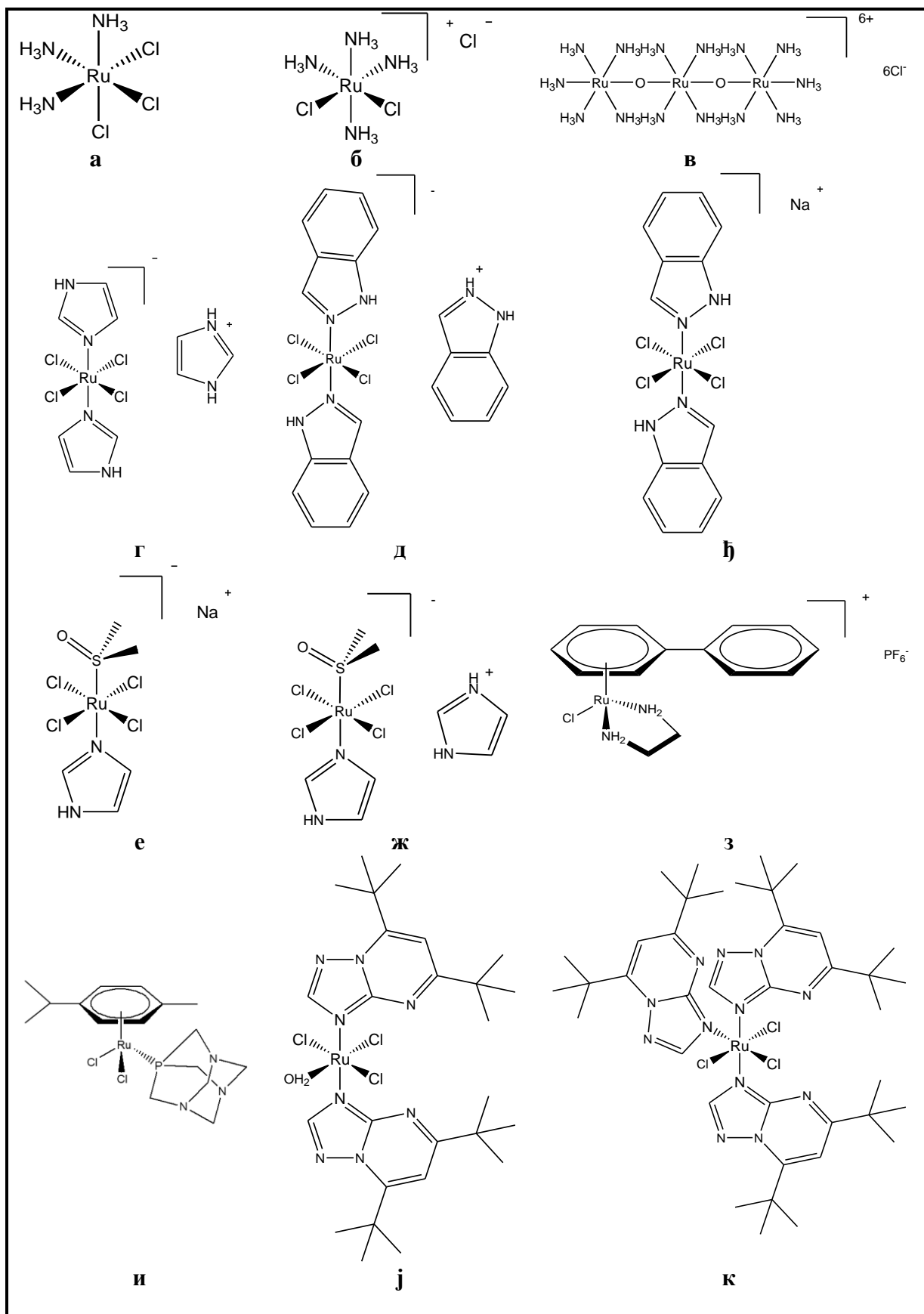


Схема 1. Комплекси рутенијума(II/III) са антитуморском активношћу *in vitro* и *in vivo* [72, 79, 83-86, 88, 89, 96, 107-110].

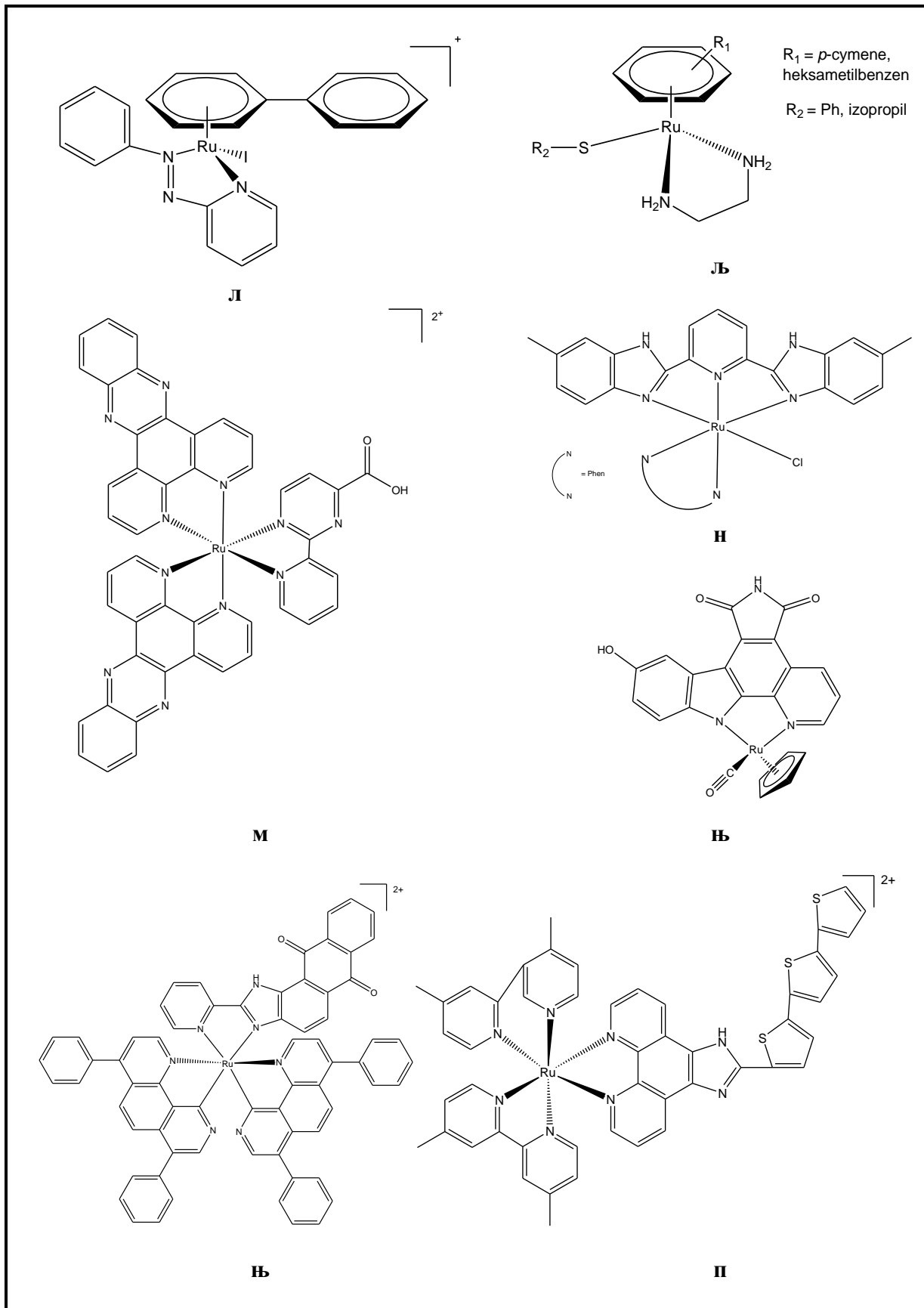


Схема 1. Комплекси рутенијума(II/III) са антитуморском активношћу *in vitro* [72, 79, 83-86, 88, 89, 96, 107-110]

1.3.2. Механизми антитуморског дејства комплекса рутенијума

Класични антитуморски агенси делују тако што се циљано везују за ДНК малигних ћелија, које се брзо деле. Међутим, недостатак ове стратегије је њихово везивање и за ДНК здравих ћелија које се такође брзо деле чиме се узрокују озбиљни токсични нежељени ефекти. Рецептори, фактори раста, протеини, ензими и ћелијски сигнални путеви који су појачано експримирани у ћелијама тумора представљају циљне мете према којима се дизајнирају нови антитуморски агенси. Селективна активација у тумору услед одређених ћелијских процеса или услед контролисане спољне активације такође, представља стратегију у дизајну нових антитуморских агенаса. Стога, спровођење опсежних студија о понашању металних комплекса у биолошким условима има за циљ да открије нове приступе за циљано лечење тумора [72, 83].

Комплекси рутенијума су препознати као ефикасна алтернатива комплекса платине, које карактеришу различити механизми дејства, као и потенцијал за превазилажење резистенције на лекове на бази платине. Потврђена *in vitro* и *in vivo* активност комплекса рутенијума је резултат њихове способности да истовремено интерагују са више циљних мета. Очекивано је да када је ћелије нападнута на више различитих начина то допринесе њиховој сензитивности на примену комплекса, што управо фаворизује испитивање таквих једињења. Механизам дејства комплекса рутенијума подразумева ометање репликације и транскрипције ДНК и следствену апоптозу, заустављање ћелијског циклуса, деловања на теломере, интеракцију са протеинима и инхибирање ензима [107].

У физиолошким условима рутенијум је присутан у више оксидационих стања (II, III и IV) мада, доминантно је присутан у облику рутенијума(III), док се остала два оксидациона стања могу лако постићи биоредукцијом (глутатионом и аскорбинском киселином) или биооксидацијом (O_2 и H_2O_2). Захваљујући редокс-потенцијалу који поседују, комплекси рутенијума(III) се активирају редукцијом када се нађу у киселом биоокружењу у коме владају хипоксични услови и повишена концентрација редукционих молекула. Када се активни рутенијум(II) комплекс нађе у здравом ткиву у нормоксичним условима, услед присуства кисеоника оксидоваће се до рутенијум(III) комплекса који је кинетички инертан. Овакав механизам “активације редукцијом” први је предложио *Clarke* са својим сарадницима, који је међу првима испитивао рутенијумске комплексе као потенцијалне антитуморске агенсе. Механизам “активације редукцијом” се сматра одговорним за селективну токсичност ка туморским ћелијама [84, 72, 83, 110, 85, 111].

Рутенијум карактерише могућност да замени функцију тровалентног јона гвожђа у биохемијским процесима јер има способност да се веже за трансферин и на тај начин селективно транспортује у ћелије карцинома, што доводи до концепта да рутенијум може да искористити физиолошки транспортни механизам гвожђа (такозвани „пут трансферина“) као начин уласка у ћелије, према стратегији „тројанског коња“. Овакав механизам транспорта је посебно атрактиван за потенцијални лек против карцинома, јер ћелије карцинома имају већу потребу за гвожђем од здравих ћелија, због повећаних метаболичких потреба и сходно томе експримирају чак 2-12 пута више рецептора за трансферин, чиме се обезбеђује селективност ка ћелијама карцинома [112, 113, 91]. Испитивањем интеракције *KP1019* и његовог имидазолског аналога *KP418* са хуманим серумским трансферином, у апо облику без гвожђа (apoTf), доказано је да, када се ови комплекси вежу за протеин, не долази до настајања нерастворних производа деградације. Нерастворни производи деградације се формирају у физиолошким условима као последица грађења аква комплекса и процеса олигомеризације [114]. Даља истраживања у погледу везивања *KP1019* за серумске протеине у крви, нису дала

резултате који потврђују релевантност предложеног „трансфериног пута“ [115, 116]. Касније је утврђено да се *KP1019* брзо везује за хумани серумски албумин, који је најзаступљенији протеин у плазми. С обзиром на чињеницу да су концентрације трансферина у крви 15-20 пута мање од концентрација албумина, испоставило се да је проценат *KP1019* који је везан за трансферин врло мали део укупне примењене количине *KP1019* комплекса. Ово откриће додатно чини механизам „трансфериног пута“ мање вероватним [116].

Постоји претпоставка да се циљана достава комплекса рутенијума у ћелије карцинома може спровести посредством албумина, захваљујући феномену повећане пропустљивости и задржавања у регији захваћеној карциномом [117]. *Kepler* је објавио кристалну структуру адукта који настаје између *KP1019* и хуманог серумског албумина [118], где се види да се два „огољена“ јона рутенијума везују за хистидин на позицијама 146 и 242, који се налазе унутар хидрофобних џепова албумина. Захваљујући овим налазима, предложено је да хумани серумски албумин заиста може да послужи као транспортер за једињења са рутенијумом и да при том обезбеди одређену селективност ка тумору, због такозваног ефекта појачане пропустљивости и задржавања [91]. Студије спроведене на пречишћеним протеинима су показале да се *NAMI-A* (његов аква облик) чврсто везује за хумани серумски трансферин и хумани серумски албумин, формирајући стабилне адукте. Првобитно се сматрало да *NAMI-A* након везивања за албумин у великој мери или чак у потпуности губи биолошка и фармаколошка својства [119]. Међутим, данас је познато да адукти формирани између *NAMI-A* и хуманог серумског албумина имају задржане фармаколошке ефекте на ћелијском нивоу, који су повезани са његовом антиметастатском активношћу [120, 121]. Такође, оба рутенијум(III) комплекса, *KP1019* и *NAMI-A*, у насталим адуктима претежно остају у оксидационом стању +3 и поред хипотезе о „активацији редукцијом“ [122].

Постизање биолошког одговора након примене комплекса рутенијума, одвија се у више фаза. Природа и наелектрисање лиганда комплекса рутенијума(II/III), имају важну улогу у кинетици измене лиганда молекулом воде. У улози одлазећег лиганда се често налази атом хлора, који у процесу хидролизе бива замењен молекулом воде, формирајући активни аква комплекс који лакше интерагује са ендогеним биомолекулима и на тај начин остварује биолошки одговор. Захваљујући високој концентрацији хлоридних јона у екстрацелуларној течности, комплекси рутенијума се приликом транспорта налазе доминантно у мање реактивном хлоро-облику, да би по уласку у ћелију у којој је концентрација хлоридних јона нижа подлегли конверзији у реактивне аква-облике (Схеми 2). Настали аква комплекси лакше интерагују са ендогеним биомолекулима и на тај начин остварају биолошки одговор. Ове интеракције се одвијају на нивоу крвне плазме, екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ), површине ћелијске мембране, цитоплазме и једра.

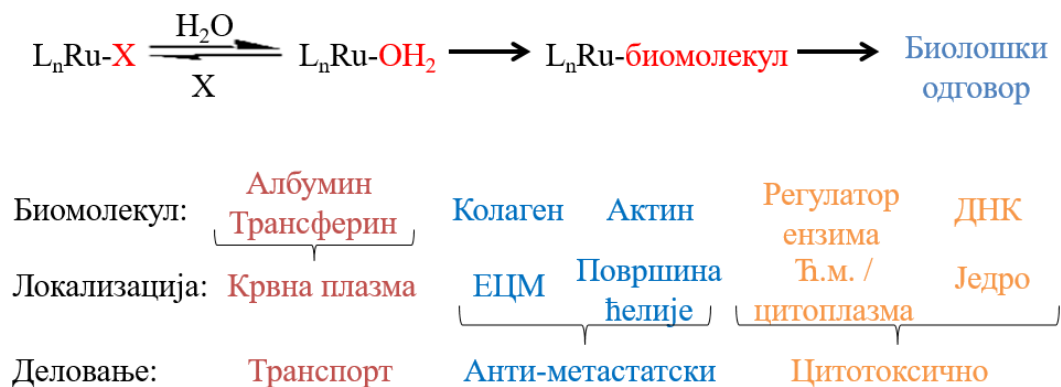


Схема 2. Сумарни приказ могуће интеракције комплекса рутенијума (L-неодлазећи лиганди; X-одлазећи лиганд) са биомолекулима на различитим ћелијским нивоима ^[86].

Brabec и група његових сарадника су 2001. године спровели студију која је анализирала интеракције *KP1019* и *NAMI-A* са молекулима ДНК у медијуму без ћелија. Резултати су показали да се оба једињења рутенијума иреверзибилно координишу са ДНК, али се њихов начин везивања за ДНК знатно разликује од начина везивања цисплатине за исти молекул. *NAMI-A* се везује за ДНК *in vitro* знатно брже од *KP1019* и цисплатине, у складу са његовом већом кинетичком реактивношћу, формирајући бифункционалне интраланчане адукте на двоструком хеликсу ДНК, док је способност *KP1019* да формира такве адукте знатно нижа. Иако везивање *KP1019* и *NAMI-A* утиче на структуру ДНК, конформационе промене изазване рутенијумским комплексима су мање од оних које узрокују комплекси платине, што резултује мање озбиљним оштећењем ДНК. Такође, унутарћелијска акумулација рутенијума и везивање за молекул ДНК је око 4,8 и 42 пута мање од оног забележеног код примене цисплатине [91, 123].

Познато је и да се неки динуклеарни и полинуклеарни рутенијум(II) полипиридил комплекси стабилно вежу за крајеве једноланчане хумане теломерне ДНК, односно G-квадриплекс (G4-ДНК) структуру теломера, која се састоји од понављајућих секвенци богатих гуанином – TTAGGG. Теломерна ДНК се скраћује после сваке деобе ћелија и након критичног скраћивања теломера, ћелије престају да се деле и долази до њихове апоптозе. Теломераза, међутим, одржава дужину теломерне ДНК и прекомерна експресија овог ензима омогућава ћелијама карцинома да се неограничено репликују и тако пролиферишу. Везивање рутенијум(II) полипиридил комплекса за G-квадриплекс структуру теломера инхибира активност теломеразе, блокира функцију репликације ДНК и спречава да нормалне ћелије постану бесмртне туморске ћелије [107].

Комплекси рутенијума имају и добру инхибиторну активност према топоизомерази, међутим у неким студијама показано је да инхибиција једног типа топоизомеразе, повећава активност других. Ради превазилажења овог проблема, синтетисани су комплекси рутенијума који инхибирају обе топоизомеразе, *Toro I* и *Toro II*, чиме се значајно инхибира пролиферација туморских ћелија [124]. Затим су дизајнирани комплекси рутенијума са двојним инхибиторним ефектом на G4-ДНК и *Toro*, чиме се постиже синергија у активацији апоптозе туморских ћелија [125, 91].

Поред тога, откривено је да се комплекси рутенијума акумулирају у органелама као што су митохондрије, ендоплазматски ретикулум, лизозоми и једро [126, 127]. Бројне студије су откриле да су митохондрије мета рутенијумских комплекса, зато што комплекси рутенијума могу брзо да сниже мембрански потенцијал митохондрија,

доведећи до дисфункције митохондрија или активације митохондријалног пута апоптозе. Следствено, овај ефекат промовише експресију про-апоптотских чланова Bcl-2 фамилије, ослобађање цитохрома C и активацију каскадних реакција чланова фамилије каспаза, како би се изазвала апоптоза туморских ћелија [128, 129]. Ендоплазматски ретикулум је кључан у апоптози туморских ћелија, аутофагији и резистенцији на лекове због чега је мета антитуморских истраживања [130]. Комплекси рутенијума могу да циљају ендоплазматски ретикулум, изазивајући оксидациони стрес и индукцију апоптозе туморских ћелија активацијом чланова фамилије каспаза [131]. Док, структура ћелијске мембране, поред тога што регулише улазак молекула лека у ћелију, такође се понаша и као мета молекула лека, стога су бројна истраживања потврдила да комплекси рутенијума директно делују на ћелијску мембрану, повећавајући њену пропустљивост што за последицу има индукцију апоптозе ћелије [132, 91].

Познато је и да неки комплекси рутенијума(II) делују као инхибитори појединих протеин киназа и да на тај начин остварују антитуморску активност [133, 134], као на пример *DW1/2*, који је инхибитор гликогенске синтаза киназе 3β и снажан активатор протеина p53, те индукује апоптозу посредством митохондријалног пута код хуманих хеморезистентних ћелија меланома, када се примени у наномоларним и пикомоларним концентрацијама [72].

Хумана тиоредоксин редуктаза (енгл. *Human Thioredoxin Reductase* - hTrxR) је никотинамид аденин-динуклеотид-фосфат (NADPH) зависан селеноензим чији је ниво повишен у бројним хуманим туморским ћелијским линијама. Има улогу у многим ћелијским процесима као што су интрацелуларни сигнални путеви, антиоксидациона заштита и редокс хомеостаза, стога може да послужи као циљна мета за дејство антитуморских агенаса. Рутенијум(II) полипиридил комплекс са 2-фенилимидазол-фенантролинским лигандом има антипролиферативно дејство на хумане меланоците, које је последица инхибиције hTrxR [135].

1.4. Токсичност индукована применом металофармацеутика

Антипролиферативни ефекат многих цитостатика резултат је дејства током S фазе ћелијског циклуса и оштећења ДНК. Управо из разлога што је њихово главно цитотоксично дејство последица утицаја на ћелијски циклус, они инхибирају раст свих здравих ткива чије се ћелије брзо деле, узрокујући тако опште токсичне ефекте, као што су: токсично дејство на костну срж (мијелосупресија), отежано зарастање рана, губитак косе, оштећење епитела црева, стерилност, тератогеност, заустављање раста код деце [1].

Бројни цитостатици, међу којима је и цисплатина, најчешће коришћени металофармацеутик, су један од примера чија је системска токсичност повезана са редокс дисбалансом коју индукују [136]. Последица индукције оксидационог стреса су токсични ефекти на разна ткива и системске органе који се манифестују као нежељена дејства [137].

Једно од најчешћих нежељених дејстава цисплатине је нефротоксичност. Акутна бубрежна инсуфицијенција се јавља код 20-30% пацијената лечених цисплатином, која када се јави повећава ризик за развој хроничне бубрежне инсуфицијенције и морталитет. Цисплатина се елиминише из организма путем бубрега гломеруларном филтрацијом и тубуларном секрецијом. Чињеница да цисплатина достиже вишеструко више концентрације у бубрежном ткиву него у крви указује на активну акумулацију лека у ћелијама паренхима бубрега. Истраживања на анималним моделима показују да цисплатина подлеже метаболичкој активацији у бубрегу до потентнијег токсичног метаболита. Овај процес започиње стварањем коњугата са глутатионом у циркулацији под дејством глутатион S-трансферазе. Приликом проласка коњугата глутатиона кроз бубрег они се разлажу до коњугата цистеинил-глицина под дејством γ -глутамил-транспептидазе која је експримирана на површини ћелија проксималних тубула. Коњугати цистеинил-глицина се даље аминоксидипептидазама метаболишу до коњугата цистеина, који се транспортују у ћелије проксималних тубула, где се даље метаболишу помоћу цистеин S-коњуговане β -лиазае до високо реактивних молекула тиола. Идентификовано је више различитих мембранских транспортера који су одговорни за транспорт цисплатине у ћелије, а најзначајнији су транспортер бакра (енгл. *Copper transporter - Ctr1*) и органски катјонски транспортер у бубрезима (енгл. *Organic Cation Transporters – OCT*) [138]. Транспорт се може одвијати и пасивном дифузијом кроз липидну мембрану епителних ћелија проксималних тубула. У реналним епителним ћелијама цисплатина подлеже метаболичкој активацији до високо реактивних молекула који утичу на ћелијски антиоксидациони систем. Промене које се јављају манифестују се смањеном активношћу SOD, CAT, GPx и смањењем концентрације GSH, GSSG и NADPH. Ове промене утичу на различите ћелијске компоненте и макромолекуле узрокујући функционална и структурна оштећења протеина, липида и ћелијских органела као што су митохондрије и ендоплазматски ретикулум. Нефротоксичност цисплатине доводи до промене броја и величине лизозома и митохондрија, поремећаја ћелијског интегритета и поларности, делокализације мембранских протеина као што је K^+/Na^+ АТФ-аза, смањења броја аквапорина, који су одговорни за промене при концентрисању урина. Зависно од дозе, цисплатина може изазвати оштећење ћелије или ћелијску смрт, тј. аутофагију, апоптозу и некрозу. Као одговор на цисплатином изазвана оштећења, повећава се број цитокина (медијатора инфламације), повећава се број леукоцита и долази до активације различитих рецептора што доводи до процеса инфламације [139]. Услед нефротоксичности која је индукована цисплатином, долази до јаког инфламаторног одговора и ослобађања великог броја проинфламаторних цитокина и хемокина. Инфламација доприноси настанку реналног оштећења и развоју

бубрежних обољења. Истраживања су показала да TNF- α има кључну улогу у регулисању инфламаторног одговора током цисплатинске нефротоксичности и примена фармаколошких инхибитора и антитела против TNF- α сузбијају продукцију других цитокина и на тај начин доприносе смањењу оштећења бубрега. Повећана концентрација TNF- α обично је праћена и значајним порастом концентрација IL-8, IL-1 β и IL-18 у ћелијама бубрежног паренхима цисплатином третираних животиња, које додатно подстичу инфламацију и цисплатином индуковано оштећење бубрега. Показано је да антиинфламаторни цитокин IL-10 доводи до смањења оштећења бубрежног ткива које индуковано цисплатином. Поред IL-10, IL-6 се такође сматрао важним анти-инфламаторним цитокином који може да заштитити од нефротоксичности изазване цисплатином. Сама примена цисплатине изазива повећану продукцију IL-6 у оштећеним бубрезима, која резултује повећаном регулацијом антиоксидационих ензима у инфламираном бубрежном паренхиму, што спречава даљи развој бубрежне дисфункције. Аналогно томе, генетска делеција IL-6 значајно смањује активност SOD и повећава експресију маркера оксидационог стреса у бубрезима оштећеним цисплатином. Примена антиоксидантних супстанци може умањити оштећења бубрега изазвана цисплатином, потврђујући важну улогу оксидационог стреса у њиховом развоју [140].

Примена високих доза цисплатине доводи до хепатотоксичности услед индукције повећане продукције ROS, са последичним оштећењем функције и структуре митохондрија. Резултати истраживања на изолованим хепатоцитима пацова који су третиранци цисплатином указују на индуковање метаболичких процеса у митохондријама, пораст оксидационог стреса који је узрокован измењеним активностима респираторних ензима у јетри и последично токсичне ефекте цисплатине на хепатоците [141]. Код пацова третиранци цисплатином забележене су повишене вредности маркера липидне пероксидације (MDA) и снижена активност антиоксидационих ензима (SOD и GPx) и GSH у ткиву јетре пацова, а у серуму повишен ниво аспартат аминотрансферазе (ACT) и аланин аминотрансферазе (АЛТ) [142].

Кардиотоксични ефекти цисплатине су такође последица редокс дисбаланса који изазива, који се испољава кроз, повећану продукцију супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$), хидроксил радикала (OH^{\bullet}) и водоник пероксид (H_2O_2), пораст нивоа малонилалдехида (MDA) и с друге стране смањење нивоа антиоксиданаса (GSH, SOD), што све заједно доводи до оштећења кардиомиоцита [143, 144].

Други најчешће коришћени металофармацеутик, оксалиплатина, такође поседује хепатотоксично дејство. Резултати спроведених студија показују да хемиотерапија која садржи оксалиплатину може проузроковати синусоидалну дилатацију код чак 78% пацијената. Након примене оксалиплатине, забележена је повећана стопа апоптозе ендотелних ћелија што доводи до повећане пропустљивости зидова крвних судова и екстравазације еритроцита у перисинусоидални простор и таложења колагена што резултује развојем перисинусоидалне фиброзе. Дилатација перисинусоидалног простора доводи до емболизације синусоида и блокирања протока крви кроз мале крвне судове узрокујући хепатичку конгестију, дилатацију синуса и последично опструктивни синдром. Тачан механизам којим оксалиплатина изазива синусоидални опструкциони синдром и даље није у потпуности разјашњен. Претпоставља се да повећана продукција ROS и пражњење депоа глутатиона у ендотелним ћелијама синусоида узрокује појачану апоптозу ових ћелија, на тај начин доводећи до оштећења. Поред тога, оксалиплатина доводи и до усходне регулације и повећане активности матрикс металопротеиназе-9, што додатно доприноси развоју синусоидалног опструкционог синдрома [145].

Оксидациони стрес индукован применом цитостатика поред тога лежи у основи већине нежељених дејстава, ометањем ћелијских функција, попут напредовања ћелијског циклуса и апоптозе, може да утиче и на смањење потентности самог цитостатика [56].

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања је да се испита антитуморски ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса на хумане и мишје ћелијске линије карцинома колона *in vitro* и у анималном експерименталном моделу карцинома колона миша *in vivo*.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Утврдити цитотоксичну активност рутенијум(II) терпиридин комплекса према мишјој (СТ26) и хуманим ћелијским линијама карцинома колона (SW480, HCT116), као и мишјим мезенхималним матичним ћелијама (mMSC), *in vitro*.
2. Утврдити доминантан тип ћелијске смрти који настаје услед примене рутенијум(II) терпиридин комплекса и њихов утицај на ћелијски циклус испитиваних ћелијских линија.
3. Утврдити утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на прогресију хетеротопског карцинома колона који је индукован субкутаном инјекцијом сингених СТ26 ћелија у дорзолумбалну регију BALB/с мишева.
4. Испитати потенцијалну системску токсичност рутенијум(II) терпиридин комплекса одређивањем концентрације аспартат аминотрансферазе (АСТ), аланин аминотрансферазе (АЛТ), урее и креатинина у серуму и патохистолошком анализом препарата ткива изолованих органа и тумора.
5. Испитати утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на заступљености ћелија имуног система у периферној крви.
6. Испитати утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на оксидациони статус у здравом и туморском ткиву.

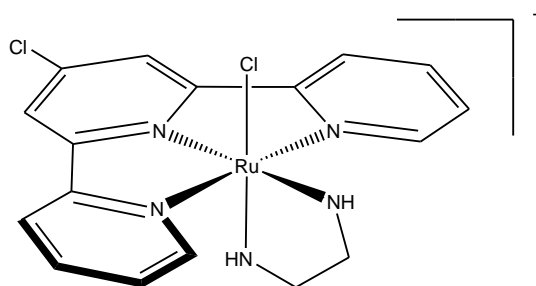
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

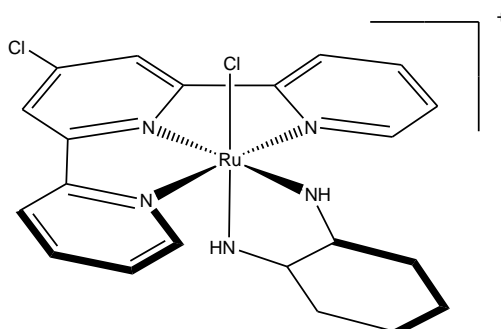
3.1. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси

Испитиване рутенијум(II) терпиридин комплексе, $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$, (енгл. *terpyridine* - tpy; *ethylenediamine* - en) за који је даље у тексту коришћена скраћеница Ru-1 (Слика 1) и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (енгл. *1,2-diaminocyclohexane* – dach) који је означен као Ru-2 (Слика 2), синтетисао је и окарактерисао проф. др Живадин Бугарчић са својим сарадницима (на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу).

Рутенијум(II) терпиридински комплекси, Ru-1 и Ru-2 поседују раније потврђену цитотоксичност према мишјој и хуманој ћелијској линији карцинома колона (СТ26 и НСТ116), хуманој ћелијској линији карцинома плућа (A549), хуманој ћелијској линији карцинома грлића материце (HeLa) и умерену цитотоксичност према здравим ћелијама, односно, хуманим фибробластима плућа (MRC-5) *in vitro* [146, 147].



Слика 1. Хемијска структура рутенијум(II) терпиридин комплекса $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$



Слика 2. Хемијска структура рутенијум(II) терпиридин комплекса $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$

3.2. Ћелијске линије и култивација ћелија

У истраживању су коришћене анимална и две хумане ћелијске линије карцинома колона, као и мезенхималне матичне ћелије изоловане из костне сржи C57Bl/6 мишева. Ћелијске линије на којима су испитивани антитуморски ефекти рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине су: ћелије карцинома колона изоловане из BALB/c мишева - CT26 (ATCC® CRL-2638™), ћелије хуманог епителног примарног колоректалног аденокарцинома (*Dukes B*) - SW480 (ATCC® CCL-228™), ћелије хуманог епителног колоректалног карцинома - HCT116 (ATCC® CCL-247™) и мезенхималне матичне ћелије миша изоловане из костне срже C57Bl/6 мишева (кат. број S1502-100, *Gibco/Invitrogen*).

Експерименти на ћелијама су извођени у кабинету са ламинарним протоком ваздуха, уз поштовање правила стерилног рада са културама ћелија и правила личне заштите у лабораторијском раду.

Ћелије су култивисане у комплетном медијуму - DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*, *Sigma Aldrich*, Немачка) коме је додато 2 mM глутамин, 100 IU пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и 10% топлотом инактивисаног феталног телећег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum* - FBS, *Capricorn Scientific*, Немачка). Медијум је механички стерилисан филтрирањем кроз нитроцелулозне филтере са порама дијаметра 0,22 µm и чуван је на температури од 4 °C до извођења експеримента.

Све ћелијске линије су чуване у течном азоту на температури од -196 °C. Одмрзавање и припрема ћелија за употребу је спровођена према стандардном поступку, тако што је крио епруветица након вађења из течног азота стављена на пар минута у водено купатило на 37 °C. Затим су ћелије пренете у епрувету са медијумом кога има у односу 1:10 и центрифугиране су 10 минута на 125 g. Након центрифугирања из епрувете је одливен супернатант, а издвојени пелет који чине исталожене ћелије је ресуспендован у свежем медијуму и пренет у T-25 флак (*BD Falcon*). Све ћелијске линије су узгајане у инкубатору на 37 °C у атмосфери са 5% угљен-диоксида (CO₂). Адекватан раст ћелија је одржаван мењањем хранљивог медијума свака три дана и пасажирањем према потреби, односно кад ћелије постигну 70% конfluентности флашка.

Пасажирање, односно пресејавање ћелија подразумева поступак одлепљивања од подлоге и поновно засејавање, како би се ћелије одржале у логаритамској фази раста. Из флашка се најпре извуче сав медијум, а полепљене ћелије се исперу фосфатним пуфером (енгл. *Phosphate-Buffered Saline* - PBS), затим се 1 ml раствора 0,25 % трипсина у 1 mM етилендиамин тетрасирћетној киселини (енгл. *Ethylenediaminetetraacetic Acid* - EDTA) дода у флак, након чега се флак врати у инкубатор на 3-5 минута. Након тога се под инвертним микроскопом погледа да ли су се ћелије одлепиле од дна флашка и ако је потребно флак се додатно мало протресе у равни, како би се ћелије што боље одлепиле од флашка и међусобно. Додавањем комплетног медијума се зауставља активност трпсина. Затим се садржај из флашка у целости пренесе у епрувету и центрифугира 10 минута на 125 g на собној температури, издвојени супернатант се одлије, а добијени пелет се ресуспендује у свежем медијуму [148].

Пред сваки експеримент са ћелијама одређиван је њихов број помоћу трипан плаво боје [149]. Ћелијска суспензија се помеша са раствором трипан плавог у разблађењу 1:9 и потом се наноси на хемоцитометар по *Neubauer*-у и посматра под светлосним микроскопом. Принцип бојења се заснива на чињеници да се мртве ћелије боје јер пропуштају боју због дезинтеграције мембране, а живе остају необојене, односно имају чисту цитоплазму. Број ћелија изражен у милионима ћелија по 1 ml је

израчунаван тако што је број ћелија/број поља помножен са разблажењем ћелија у боји и помножен са 10000.

3.3. *In vitro* методе за испитивање цитотоксичног потенцијала рутенијум(II) терпиридин комплекса

Како би испитали утицаја рутенијум(II) терпиридин комплекса на вијабилност ћелија, најпре смо засејали ћелије у микротитар плоче са 96 бунара. Ћелије су остављене преко ноћи у условима инкубације, како би се што боље адхерирале за дно флашка, након чега су третиране у трипликату различитим концентрацијама рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине. Након периода инкубације од 24 или 72 часова, спроведени су тест вијабилности (МТТ тест) и тест испитивања интегритета ћелијских мембрана (LDH тест) који су засновани на принципима спектрофотометрије.

3.3.1. МТТ тест

МТТ тест је метода која служи за одређивање вијабилности ћелија. МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (*Sigma Aldrich*, Немачка), је жути кристал, растворљив у води, који лако пролази кроз ћелијску мембрану због свог позитивног наелектрисања. У метаболички активним ћелијама, митохондријална дехидрогеназа редукује МТТ до несолубилних љубичастих кристала формазана, па је тако редукција МТТ до формазана директно пропорционална броју живих ћелија. Тако да се ефекат испитиване супстанце заправо одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Настали формазан се раствара у диметил сулфоксиду и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на *ELISA* читачу (*Microplate multimode detector Zenyth 3100*) читавањем на таласној дужини од 595 nm [150]. Ћелијска суспензија густине 5×10^4 ћелија/ml, припремљена је тако што су ћелије у експоненцијалној фази раста прикупљене из флашка на претходно описан начин и њихов број је одређен помоћу *Neubauer*-ове коморе, уз коришћење трипан плаве боје. У микротитар плоче са 96 бунара је сипано по 100 μ l ћелијске суспензије (5000 ћелија по бунару), а у одређене бунарчиће је сипан само медијум како би се одредила густина самог медијума – бленк, која је битна за израчунавање процента вијабилних ћелија. Након 24-часовне инкубације у стандардним условима култивације ћелија, извучен је медијум и ћелије су излагане растворима рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине или само медијуму (контрола) у запремини од 100 μ l у концентрацијама у распону од 0,23 μ M до 300 μ M (0,23 μ M, 4,68 μ M, 9,37 μ M, 18,75 μ M, 37,5 μ M, 150 μ M и 300 μ M), након чега је уследио период инкубирања ћелија са испитиваним једињењима или само у медијуму (представља контролу) у трајању од 24 сата и 72 сата. Након инкубације испражњени су сви бунари микротитар плоче и у сваки бунар је додато по 100 μ l медијума са 20% МТТ раствора (5 mg/ml у PBS) и ћелије су инкубирале још 4 часа на 37 °C у атмосфери са 5% CO₂. По истеку инкубације медијум је извучен и у сваки бунар је додато по 150 μ l DMSO (*Sigma Aldrich*, Немачка) и 20 μ l глицинског пуфера (pH 10,5) и затим је плоча стављена на шејкер у трајању од 30 минута. Оптичка густина одређена је на таласној дужини од 595 nm. Процент вијабилних ћелија је израчунат према формули: % вијабилних ћелија = $(E-B)/(K-B) \times 100$, где је са E-означен отвор са испитиваним супстанцама, B-бленк, K-отвор са нетретираним ћелијама.

3.3.2. Тест за одређивање активности лактат-дехидрогеназе (LDH тест)

Интактност ћелијске мембране, односно нарушавање њеног интегритета као показатеља ћелијске смрти по типу некрозе, утврђује се применом теста који мери активност цитосолног ензима лактат дехидрогеназе (енгл. *Lactate dehydrogenase* - LDH) у супернатанту ћелијске културе. Приликом нарушавања интегритета ћелијске мембране, цитосолни ензим LDH пролази кроз исту и доспева у медијум у којем се ћелије налазе. Принцип LDH теста се заснива на две оксидо-редукције. У првој се лактат оксидује у пируват, при чему се NAD^+ редукује до $\text{NADH} + \text{H}^+$. У наредној реакцији дијафоразе (NADPH дехидрогеназа) посредује у реоксидацији $\text{NADH} + \text{H}^+$ у NAD^+ при чему се тетразолијумска со редукује до обојеног формаза. За спровођење теста су поред контролне групе потребне и група нетретираних ћелија (живе ћелије) и позитивна контрола (100% мртве ћелије). Позитивну контролу су чиниле лизирание ћелије које су третиране са 1/10 запремине *LDH Assay Lysis Solution* у трајању од 45 минута и услед потпуног нарушавања интегритета ћелијске мембране максимално ослобађају цитосолну LDH. Након 24 сата инкубације ћелија са испитиваним комплексима, супернатант је покупљен и пребачен у нове микротитар плоче. У 100 μl супернатанта је додато по 100 μl радног раствора LDH кита (*Lactate Dehydrogenase Assay Mixture* (који се припрема мешањем једнаких запремина *LDH Assay Substrate Solution*, *LDH Assay Dye Solution* и *1' LDH Assay Cofactor Preparation*). Плоче су инкубирание 30 минута у мраку на собној температури, а затим је у сваки отвор микротитар плоче додато по 20 μl 1N хлороводоничне киселине. Пораст LDH активности директно корелира са количином створеног формаза па је интензитет боје директно пропорционалан броју мртвих ћелија. Оптичка густина узорака је мерена на $\lambda=490 \text{ nm}$ на *Zenyth 3100* мултифункционалном читачу [151]. Резултати су приказани у процентима (%) некротичних ћелија и израчунати су према формули: $[(E-K)/(M-K)] \times 100$, где је E – апсорбанца третираних ћелија, K – апсорбанца контролних (нетретираних) ћелија, M – апсорбанца мртвих ћелија добијених лизирањем са *LDH Assay Lysis Solution*.

3.3.3. Тест за детекцију апоптозе (*Annexin V/PI*)

Висок афинитет протеина *Annexin V* према фосфатидил-серину га чини погодним маркером апоптозе ћелија, с обзиром на чињеницу да у фази ране апоптозе долази до транслокације фосфатидил-серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. У фази касне апоптозе и некрозе долази до оштећења мембране ћелије што омогућава пропидијум јодиду (енгл. *Propidium Iodide* - PI) да се се неспецифично интеркалира у молекуле ДНК, стога се користи за разликовање некротичних ћелија од апоптотских и вијабилних ћелија. Сходно томе, ћелије које се боје позитивно *Annexin V-FITC* и негативно PI (*Annexin V⁺PI⁻*) су ћелије у раној апоптози, док су виталне ћелије негативне на обе боје (*Annexin V⁻PI⁻*). Ћелије које су позитивне на обе боје (*Annexin V⁺PI⁺*) су у касној апоптози, а некротичне ћелије се боје само PI (*Annexin V⁻PI⁺*) [152].

Након 24-часовног третмана ћелијских линија СТ26, НСТ116, SW480 и mMSC, одговарајућим IC_{50} концентрацијама (половина максималне инхибиторне концентрације) рутенијм(II) терпиридинских комплекса и оксалиплатине, ћелије су пребачене у епрувете. Најпре је пребачен медијум у ком су ћелије биле, а затим су ћелије третиране трипсином и пребачене у исте епрувете. Након центрифугирања од 10

минута на 500 g, одливен је супернатант, а ћелије ресуспендоване у 1 ml хладног раствора PBS, промешане на вортексу и поново центрифугиране на исти начин. Након одливања супернатанта, приступило се бојењу ћелија по упутству произвођача. Ћелије су ресуспендоване у 100 μ l пуфера (10X пуфер: 0,1 M HEPES, pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) који омогућава везивање *Annexin V* коњугованог са флуоресцентном бојом FITC (енгл. *Fluorescein Isothiocyanate*) (*BD Pharmingen, San Diego, California, USA*) до густине 1000000 ћелија/ml. У 100 μ l такве суспензије додато је по 5 μ l *Annexin V-FITC* и 5 μ l PI (50 μ g/ml PBS) (*Sigma Aldrich, Немачка*). Након инкубације од 15 минута на собној температури у мраку, реакција је прекинута додавањем по 400 μ l 1X пуфера у сваки узорак. Анализа је изведена на проточном цитометру *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) *Calibur flow cytometer* (*BD Biosciences, San Jose, USA*), а резултати су представљени тачкастим дијаграмом као проценат одговарајућих ћелијских популација у укупном броју анализираних ћелија. Процентуална заступљеност вијабилних и некротичних ћелија, као и ћелија у фази ране или касне апоптозе одређивана је употребом софтвера *Flowing Software* и *FlowJo*.

3.4. Анализа ћелијског циклуса

За анализу процентуалне заступљености испитиваних ћелијских линија (CT26, HCT116, SW480 и mMSC) у одређеној фази ћелијског циклуса коришћен је *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* кит (*Thermo Fisher Scientific, Inc. USA*). *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* се користи за анализу садржаја ДНК у живим ћелијама. Након што поменута боја лако прође кроз ћелијску мембрану и двоструко се веже за молекулу ДНК, на основу интензитета флуоресценције може се одредити количина молекула ДНК у анализираним ћелијама које се налазе у одређеној фази ћелијског циклуса.

Након постизања конфлуентности у фласковима од 70-80%, ћелијске линије (CT26, HCT116, SW480 и mMSC) су инкубирани 24 сата при стандардним условима, IC₅₀ концентрацијама оксалиплатине и рутенијум(II) терпиридинских комплекса, као и свежим медијумом (контрола). Након истека инкубације, ћелије су опране у комплетном медијуму. Ћелије су након тога ресуспендоване до густине ћелијске суспензије од 5×10^5 ћелија/ml. За даљу анализу одмерено 0,5 ml ћелијске суспензије у коју је додат 1 μ l *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* боје. Узорци су након тога инкубирани 30 минута на температури од 37 °C, ван домашаја светлости. Анализа је извршена помоћу проточног цитометра *FACS Calibur flow cytometer* (*BD Biosciences, San Jose, USA*) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (*Tree Star*).

3.5. *In vivo* експерименти

3.5.1. Лабораторијске животиње

У спроведеном истраживању, као експерименталне животиње коришћени су мишеви (лат. *Mus musculus*) соја BALB/c, мушког пола. Животиње су узгајане у групном кавезном смештају (3-4 животиње по кавезу) у стандардним лабораторијским условима који подразумевају температуру просторије од 22-24 °C, циклус светло-тама од 12 сати, уз доступност хране и воде *ad libitum*. У експериментима су коришћени мишеви старости 6-8 недеља, просечне масе 22 ± 2 грама, 12 мишева по групи.

За експерименте на лабораторијским животањама претходно је добијена сагласност Етичког комитета за рад на лабораторијским животињама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (01-8461/2).

3.5.2. Индуkcија експерименталног модела карцинома колона

За потребе нашег истраживања, користили смо хетеротопски сингени модел карцинома колона (модел ектопичног туморског ксенографта). Овај анимални модел је хетеротопски – јер се ћелије тумора апликују у место другачије од оног где се тумор иначе развија и модел је сингени - јер су коришћена ћелијска линија карцинома колона - CT26 и BALB/c мишеви истог генског порекла.

Хетеротопски модел карцинома колона је индукован субкутаном апликацијом 1×10^6 CT26 ћелија, сингених за BALB/c мишеве, ресуспендованих у 100 μ l DMEM-а у леву дорзолумбалну регију која је претходно обријана [153, 154]. Појава примарног тумора праћена је свакодневно, детекцијом палпабилног примарног тумора, а његова величина одређивана је морфометријски, коришћењем калипера. Волумен тумора је израчунаван по формули: $V (\text{mm}^3) = L (\text{највећи промер}) \times W^2 (\text{најмањи промер}^2) / 2$.

Мишеви су сврстани у 12 експерименталних група од по 12 мишева, а затим је сваки миш у оквиру групе обележен тако што му је пробушено уво, лево, десно, оба или ниједно, како би био праћен индивидуално. Мишеви су били подељени у 2 основне групе: здраве мишеве и мишеве са индукованим карцином колона, а затим су основне групе подељене у зависности од третмана. Контролна група мишева је третирана физиолошким раствором (0,9% NaCl), а експерименталне групе мишева су третиране растворима рутенијум(II) терпиридин комплекса (Ru-1 или Ru-2) или оксалиплатином раствореном у физиолошком раствору, у дози од 2 mg/kg и 5 mg/kg телесне масе.

- 1) контролна група (здрави мишеви - апликација 200 μ l 0,9% NaCl) - **0,9% NaCl**
- 2) здрави мишеви – апликација 5 mg/kg [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] - **Ru-1**
- 3) здрави мишеви - апликација 5 mg/kg [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] - **Ru-2**
- 4) здрави мишеви – апликација 5 mg/kg оксалиплатине - **Ox**
- 5) мишеви са CT26 тумором - апликација 200 μ l 0,9% NaCl - **CT26**
- 6) мишеви са CT26 тумором - апликација 5 mg/kg [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] - **CT26+Ru-1**
- 7) мишеви са CT26 тумором - апликација 5 mg/kg [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] - **CT26+Ru-2**
- 8) мишеви са CT26 тумором - апликација 5 mg/kg оксалиплатине - **CT26+Ox**
- 9) мишеви са CT26 тумором - апликација 200 μ l 0,9% NaCl - **CT26**
- 10) мишеви са CT26 тумором - апликација 2 mg/kg [Ru(Cl-tpy)(en)Cl][Cl] - **CT26+Ru-1**
- 11) мишеви са CT26 тумором - апликација 2 mg/kg [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl][Cl] - **CT26+Ru-2**
- 12) мишеви са CT26 тумором - апликација 2 mg/kg оксалиплатине - **CT26+Ox**

Мишевима су интраперитонеално инјектовани рутенијум(II) терпиридин комплекси или оксалиплатина ресуспендовани у 200 μ l физиолошког раствора, помоћу инсулинског шприца, по шеми: 6. дана, 9. дана, 12. дана и 15. дана од инокулације СТ26 ћелија. За време трајања експеримента праћено је преживљавање мишева, а телесна маса мишева је мерена сваки трећи дан, непосредно пре апликације испитиваних комплекса, како би дозирање било што прецизније. Такође, сваки трећи дан одређиван је и волумен тумора. Експеримент је трајао укупно 18 дана, а мишеви су жртвовани 13. дан од прве апликоване дозе и том приликом је сакупљена крв и изоловани су унутрашњи органи (срце, бубрези, плућа, јетра), као и примарна туморска маса за даље анализе [155, 156].

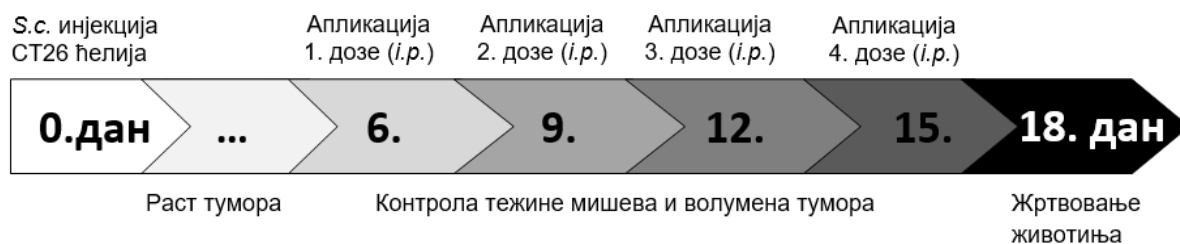


Схема 3. Схематски приказ протокола *in vivo* експеримента изведених на BALB/c мишевима којима је индукован хетеротопски модел СТ26 карцинома колона и третирани су рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином.

3.6. Евалуација потенцијалне системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса

Системска токсичност рутенијум(II) терпиридин комплекса на огледне животиње је евалуирана путем одређивања серумских вредности креатинина и урее ради процене нефротоксичности, одређивања серумских вредности АСТ и АЛТ - ради процене хепатотоксичности, а тест за процену брзине реакције на термални стимулус (тест вруће плоче) је спроведен ради процене евентуалне неуротоксичности.

3.6.1. Биохемијске анализе

Након 72 сата од последње апликоване дозе испитиваних комплекса, мишеви су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром (*BETA NEM*, Београд). Крв је сакупљена пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (20 минута на 3000 *rpm*) ради одређивања концентрације урее и креатинина (као показатељи бубрежне функције), и активности ензима аспартат аминотрансферазе (АСТ) и аланин аминотрансферазе (АЛТ) (као показатељи функције јетре). Анализа је урађена помоћу биохемијског анализатора *Cobas Mira Plus, Roche*.

3.6.2. Патохистолошка анализа

Након жртвовања мишева изоловани су срце, плућа, јетра, бубрези и примарна туморска маса за патохистолошку анализу. Изоловани органи су фиксирани у 10 пута већој запремини 10% раствора формалдехида на собној температури. Након фиксирања, ткиво је испрано дестилованом водом, а затим је урађена дехидратација ткива провлачењем кроз серију алкохола растуће концентрације, почев од 30% етанола, преко 50%, 70%, 96% до 100% етанола. Даље је спроведено просветљивање ткива тако што су ткива држана у ксилолу два пута по 5-15 минута, након чега су ткива калуљења у парафину. Ткиво је стављено у загрејани парафин у коме је било сат времена, при чему је температура одржавана на 55 °С. Након тога је извађено из термостата и остављено преко ноћи на собној температури. Тако укалуљено ткиво је затим исецано из парафина и сечено на микротому чиме су добијени пресеци ткива, дебљине 5 μm , који су постављани на микроскопске плочице. Након сушења плочица, препарати су били спремни за бојење.

Хематоксилин-еозин бојење се користи за приказивање структурних промена у морфологији ткива и присуства евентуалне некрозе. Хематоксилин је базна (позитивна) боја која се везује за базofilне супстанце (ДНК, РНК) и боји ткиво у тамно плаво или љубичасто. Еозин је кисела (негативна) боја, везује се за ацидоphilне супстанце (протеини) и боји ткиво у црвено или розе.

Парафински исечци су најпре загрејани у термостату на +56 °С у трајању од 45 минута, а затим је урађена депарафинизација и рехидратација ткива, тако што су плочице са пресецима ткива провлачене прво кроз ксилол, а затим кроз серију алкохола опадајуће концентрације, и то два пута по 5 минута у 100% етанолу, преко 96%, 90% и 70% етанола. Рехидратација ткива је изведена тако што су плочице са препаратима држане 5 минута у дестилованој води. Након тога препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, а затим су испрани дестилованом, а потом и текућом водом у трајању од 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 2 минута. Након бојења спроведен је процес дехидратације, тако што су плочице провлачене кроз серију алкохола растуће концентрације, редом кроз 70%, 96% и 100% етанол, а затим је просветљено у ксилолу. Добијени препарати су затим просветљени потапањем у току једног минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (BX51, *Olympus, Јапан*).

3.6.3. Тест вруће плоче

Ради процене евентуалне неуротоксичности спроведен је тест вруће плоче [157], помоћу ког је одређена брзина реакције на термални стимулус [158]. Тест је спроведен тако што је експериментална животиња постављена на средину плоче, чија је температура $51 \pm 0,5$ °С. Дужина трајања теста је дефинисана појавом реакције на топлоту, која је подразумевала: лизање задње шапице, трешење задње шапице или одскакивање од подлоге (са сва четири екстремитета истовремено). Трајање теста је ограничено на 60 секунди, како би се спречио настанак опектоина [159]. Параметар који је праћен у тесту вруће плоче је време до реакције (изражено у s). Тест је спроведен дан пре жртвовања животиња.

3.6.4. Проточна цитометрија

Заступљеност појединих ћелија имуног система у крви, одређивана је из крви сакупљене пункцијом абдоминалне аорте у епрувете са хепарином. За бојење мембранских маркера ради фенотипизације популације ћелија крви коришћена су анти-мишија моноклонска антитела различите специфичности: CD4 (обележивач – PE (енгл. *Phycoerythrin*), произвођача - *BD Pharmingen*); CD8 (APC (енгл. *Allophycocyanin*), *BD Pharmingen*); CD49b (FITC, *Biolegend*); CD11c (PE, *Molecular probes*); CD11b (APC, *BD Pharmingen*); Ly6c⁺ (FITC, *BD Pharmingen*); Ly6c⁻ (PerCp (енгл. *Peridinin-Chlorophyll-Protein*), *Biolegend*) након чега се приступило одређивању процентуалног удела CD4⁺ Т лимфоцита, CD8⁺ Т лимфоцита, NK ћелија, NKT ћелија, моноцита, неутрофила и дендритских ћелија, помоћу проточног цитометра *FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA)* а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (*Tree Star*).

3.6.5. Параметари оксидационог стреса

Након 72 сата од последње апликоване дозе испитиваних комплекса, мишеви су жртвовани, а изоловани органи и туморска маса су складиштени у пластичне епрувете са поклопцем и замрзнути на -80 °C. Непосредно пред анализу, узорци ткива (срце, јетра, плућа, бубрег и туморска маса) су одмрзнути, измерени, мацерирани и додат им је 0,2 М фосфатни пуфер, рН ~ 7,4, у односу 1:10 (0,5 g ткива : 5 ml пуфера). Ткива су хомогенизова на електричном хомогенизатору 3x10 секунди (са паузом од 10 секунди). Добијени хомогенат је центрифугиран на 1200 g, 20 минута на температури од 4 °C. Издвојени супернатант је коришћен за одређивање индекса липидне пероксидације и ензима антиоксидационе заштите: супероксид-дисмутазе и каталазе и неензимског антиоксиданса – глутатиона [160].

3.6.5.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS)

У хомогенату ткива је индиректно одређиван индекс липидне пероксидације, преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином (енгл. *Thiobarbituric Acid* - TBA), отуда скраћеница TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* - TBARS).

Екстракција TBARS из хомогената ткива је спроведена по следећем протоколу: у епрувете је најпре пипетирано 0,4 ml 28 % TCA, а затим додато и 0,8 ml хомогената ткива. Тако добијени узорци су инкубирани у леденом куратилу на температури од -4 °C у току 10 минута, након чега су центрифугирани 10 минута на 15000 rpm (обртаја у минути, од енгл. *revolutions per minute*), ради издвајања супернатанта који је коришћен у даљој анализи као екстракт хомогената. Од добијеног супернатанта се пиретира 400 µl у епрувету у коју се дода 100 µl 1% TBA у 0,05 М NaOH. За слепу пробу, уместо екстракта хомогената, коришћена је иста количина дестиловане воде. Узорци су инкубирани у воденом куратилу на 100 °C у току 15 минута, након тога су охлађени до собне температуре, после чега се приступило спектрофотометријском одређивању концентрације ослобођених TBARS на таласној дужини, λ= 530 nm [161].

3.6.5.2. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Активност SOD одређивана је тако што је у 100 μl екстракта хомогената ткива, пипетирано 1000 μl карбонатног пуфера, након чега је садржај епрувете измешан на *Vortex*-мешалици, а потом је додато 100 μl адреналина. Одређивање SOD се заснива на епинефринској методи по *Beutler*-у, односно на способности SOD да неутралише супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$) који настаје спонтаном аутооксидацијом адреналина у базној средини и на тај начин инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски, а повећање апсорбанце на таласној дужини $\lambda=480\text{ nm}$ потиче од накупљања адренохрома. За слепу пробу су коришћене еквивалентне количине реагенаса [162].

3.6.5.3. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе у екстракту хомогената ткива одређивана методом по *Beutler*-у, која се заснива на спектрофотометријском праћењу брзине разградње молекула H_2O_2 у присуству CAT на $\lambda=230\text{ nm}$.

У кварцну кивету је пипетирано 50 μl CAT пуфера, коме је додато 100 μl претходно разблаженог екстракта хомогената ткива (дилуција дестилованом водом у односу 1:7 и додавањем етанола у односу 0,6:1) и 1 ml 10 mM H_2O_2 . Пад апсорбанце је праћен тако што је узорак мерен 6 узастопних пута на таласној дужини $\lambda=230\text{ nm}$. За слепу пробу коришћена је дестилована вода уместо узорка [163].

3.6.5.4. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Глутатион је присутан у оксидованој форми као GSSG, који се ензимом глутатион-редуктазом лако преводи у редуковани облик GSH. Садржај GSH у хомогенату ткива одређен је спектрофотометријском методом која се заснива на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дитиобис-2-нитробензојем киселином (енгл. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) – DTNB) методом по *Beutler*-у.

GSH је екстрахован тако што је у 50 μl хомогената ткива додато 200 μl 0,1% EDTA и 385 μl пуфера за преципитацију. После мешања на *Vortex*-мешалици, уследила је инкубације на леду у трајању од 15 минута и 10 минута центрифугирања на 4000 *rpm*, издвојени супернатант (екстракт) је коришћен за даљу анализу. У епрувете је пипетирано 300 μl екстракта, 750 μl Na_2HPO_4 и 100 μl DTNB и садржај епрувете је инкубиран 10 минута, након чега је спроведено мерење на спектрофотометру на таласној дужини, $\lambda=412\text{ nm}$. За слепу пробу уместо узорка, коришћен је исти волумен дестиловане воде. Како би одредили концентрацију GSH у узорцима, конструисана је калибрациона крива помоћу четири стандарда са познатим концентрацијама глутатиона [164].

3.7. Статистичка обрада података

3.7.1. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на претходно публикованим резултатима на основу података о величини примарног колоректалног тумора мишева у студији сличног дизајна [165]. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа (α) грешку од 0,05 и снагу студије од 0,8 (бета (β) грешка 0,2) за *Student's t* тест (два независна узорка), према статистичком програму *G*Power3* [166].

На основу очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролне група, утврђен је потребан број експерименталних животиња и он је износио 12 мишева по групи.

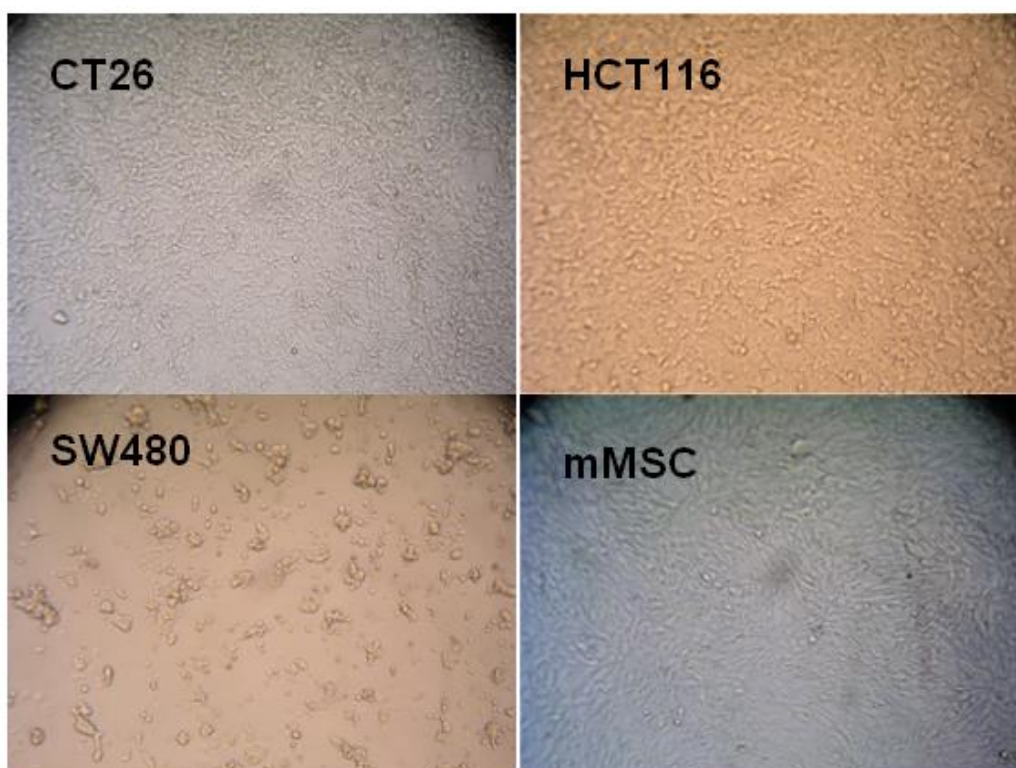
За статистичку обраду података коришћен је програма *SPSS* верзија 20 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*). Нормалност расподеле је одређена тестом *Shapiro-Wilk*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's t* тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney U* тест. Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајном разликом сматране су добијене вредности $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Резултати МТТ теста

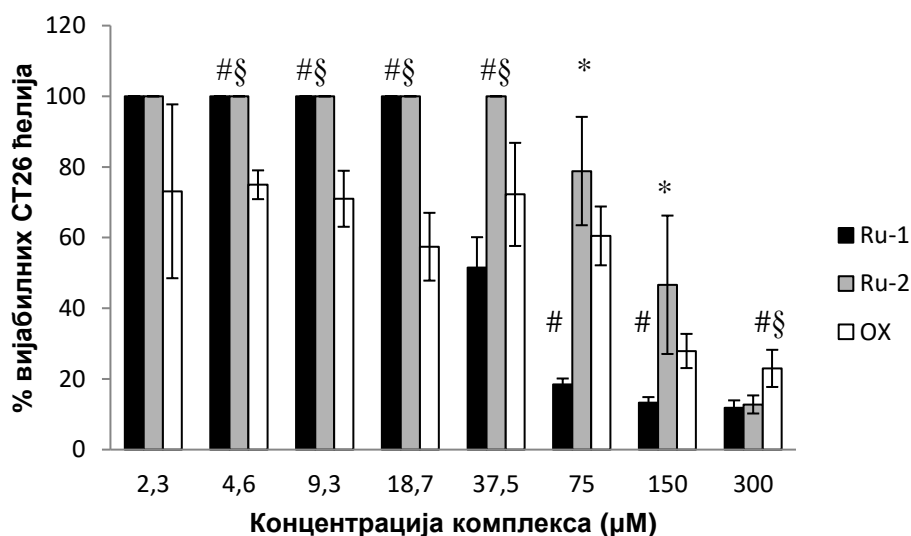
У циљу испитивања цитотоксичног потенцијала комплекса $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$ - Ru-1 и $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$ - Ru-2, МТТ тестом је анализирана вијабилост хуманих и мишјих ћелија карцинома колоне, као и мезенхималних матичних ћелија миша након излагања комплексима рутенијума(II) у двоструко растућој концентрацији (2,3-300 μM) у временском периоду од 24 и 72 сата. Ради поређења цитотоксичне активности испитиваних комплекса као референтно једињење коришћена је оксалиплатина.



Слика 3. Ћелијске линије на којима су испитивани цитотоксични ефекти рутенијум(II) терпиридин комплекса: CT26 - ћелије карцинома колоне изоловане из BALB/c мишева; SW480 - ћелије хуманог епителног примарног колоректалног аденокарцинома (*Dukes B*); HCT116 - ћелије хуманог епителног колоректалног карцинома и mMSCs - мезенхималне матичне ћелије миша.

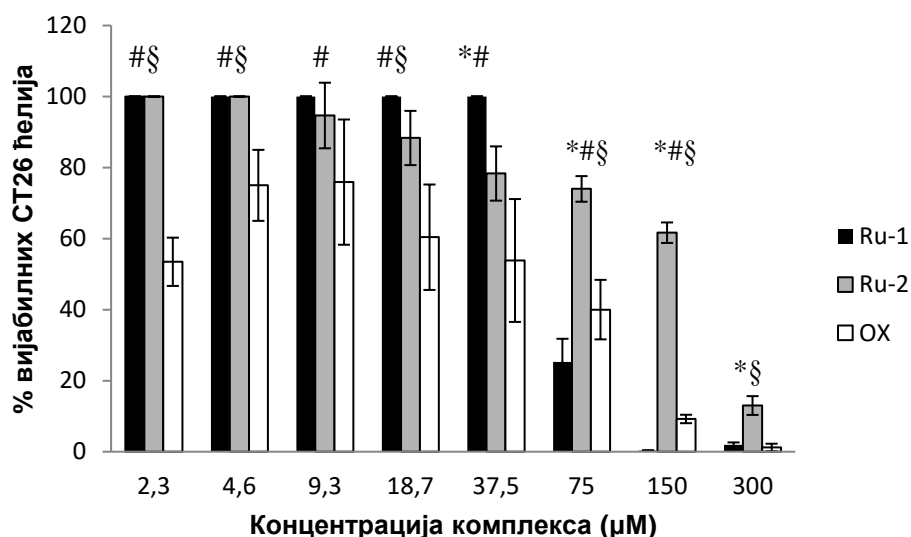
4.1.1. Рутенијум(II) терпиридин комплекси редукују вијабилност ћелија карцинома колона миша - СТ26

Након 24-часовне култивације СТ26 ћелија у присуству двоструко растућих концентрација комплекса Ru-1 од 2,3 до 300 μM , дошло је до статистички значајног пада вијабилности СТ26 ћелија у односу на процентуалну заступљеност вијабилних СТ26 ћелија третираних са Ru-2, и то при концентрацијама 37,5 μM , 75 μM , 150 μM , док се њихова цитотоксичност према СТ26 ћелијама изједначава при највишој примењеној концентрацији. Такође је запажено да долази до статистички значајног пада вијабилности СТ26 ћелија које су биле изложене нижим концентрацијама оксалиплатине у односу на оба рутенијум(II) терпиридинска комплекса, док при вишим концентрацијама Ru-1 показује статистички значајно смањење вијабилности СТ26 ћелија у односу на оксалиплатину. Након 24-часовног третмана СТ26 ћелија оксалиплатином, дошло је до значајног пада вијабилности у односу на вијабилност СТ26 ћелија третираних са Ru-2 при концентрацијама од 4,68 μM до 37,5 μM , док је при највишој примењеној концентрацији Ru-2 показао статистички значајно израженију цитотоксичност у односу на оксалиплатину (**Графикон 1**).



Графикон 1. Вијабилност СТ26 ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, *Student's t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

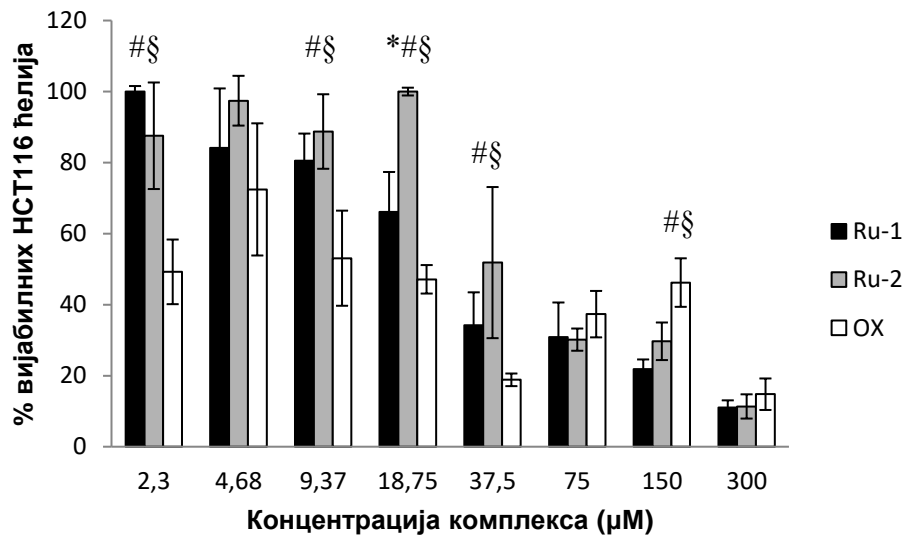
Након 72-часовне инкубације СТ26 ћелија са испитиваним комплексима, уочава се да Ru-2 доводи до пада вијабилности СТ26 ћелија, уз постизање статистичке значајности на концентрацији 37,5 μM , у односу на Ru-1, док при вишим концентрацијама Ru-1 има јаче цитотоксично дејство, тачније након примене Ru-1 у концентрацијама 150 μM и 300 μM није било преживелих ћелија. Након 72-часовног третмана СТ26 ћелија оксалиплатином примећен је исти тренд као и након 24-часовне култивације, са том разликом да при дужем излагању СТ26 ћелија највишој концентрацији оксалиплатине није било преживелих ћелија. Примена оксалиплатине је статистички значајно снизила вијабилности СТ26 ћелија током 72-часовне инкубације, при већини концентрација, у односу на проценат вијабилних СТ26 ћелија третираних рутенијум(II) терпирин комплексима (Графикон 2).



Графикон 2. Вијабилност СТ26 ћелија након 72-часовне инкубације са рутенијум(II) терпирин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, Student's *t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

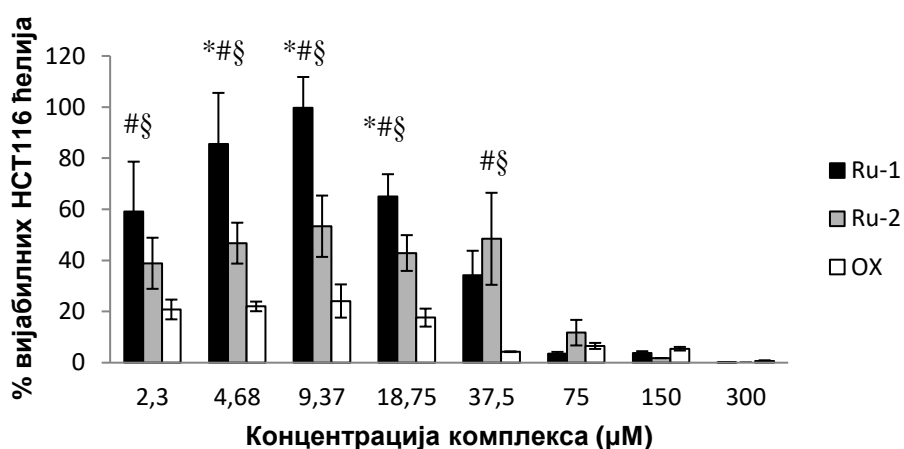
4.1.2. Рутенијум(II) терпирин комплекс редукују вијабилност ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116

Испитивањем цитотоксичног ефекта Ru-1 након 24-часовне инкубације са НСТ116 ћелијама, запажен је статистички значајан пад у проценту вијабилних НСТ116 ћелија при примењеној концентрацији - 18,75 μM , у поређењу са процентом вијабилних НСТ116 ћелија третираних са Ru-2. Такође је запажено да оксалиплатина при нижим концентрацијама доводи до значајног смањења процента живих НСТ116 ћелија у поређењу са применом рутенијум(II) комплекса, док су при концентрацији - 150 μM , оба комплекса рутенијума(II) довела до значајног пада процента вијабилних НСТ116 ћелија у поређењу са оксалиплатином, да би се њихов цитотоксични ефекат према НСТ116 ћелијама изједначио при концентрацији од 300 μM (Графикон 3).



Графикон 3. Вијабилност НСТ116 ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпирин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, Student's *t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

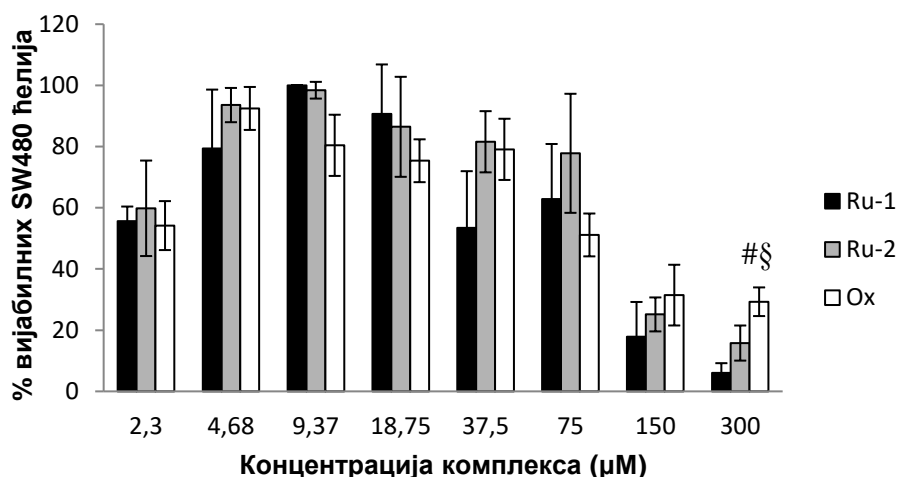
Цитотоксични ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса након 72-часовне инкубације са НСТ116 ћелијама је сличан ефектима постигнутим након 24-часовне инкубације, односно није било статистички значајне разлике између Ru-1 и Ru-2 у смањењу вијабилности НСТ116 ћелија, оба комплекса при концентрацијама вишим од 75 μM у потпуности убијају НСТ116 ћелије. Док оксалиплатина доводи пада процента вијабилних НСТ116 ћелија уз постизање статистичке значајности при нижим концентрацијама у поређењу са Ru-1 и Ru-2, да би се њихова ефикасност у погледу цитотоксичности изједначила при концентрацијама вишим од 75 μM (Графикон 4).



Графикон 4. Вијабилност НСТ116 ћелија након 72-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, *Student's t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

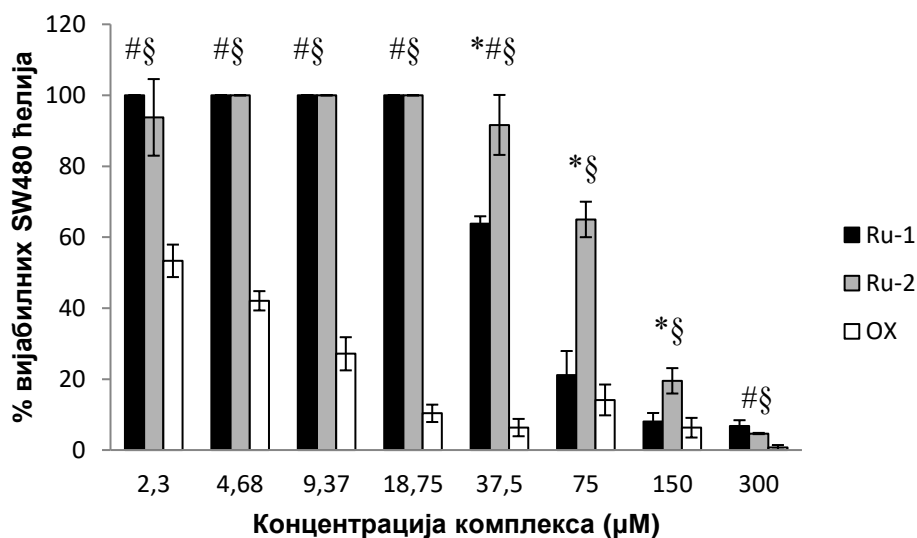
4.1.3. Рутенијум(II) терпирин комплексни редукују вијабилност ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480

При култивацији SW480 ћелија у трајању од 24 часа примећен је исти тренд код сва три испитивана комплекса. Оба комплекса рутенијума(II) су довела до пада процента вијабилних SW480 ћелија уз постизање статистичке значајности при највишој примењеној концентрацији - 300 μM , у поређењу са оксалиплатином (**Графикон 5**).



Графикон 5. Вијабилност SW480 ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпирин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, *Student's t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. Ox; § Ru-2 vs. Ox).

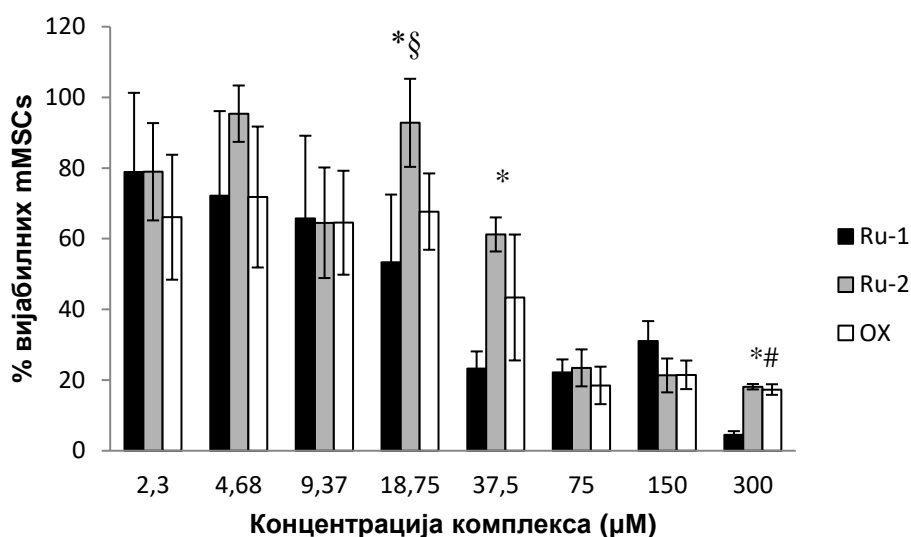
Након 72-часовног третмана SW480 ћелија рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, јасно се уочава дозно-зависно повећање цитотоксичности. При култивацији SW480 ћелија у трајању од 72 часа, Ru-1 је довео до статистички значајног смањења вијабилности при концентрацијама од 37,5 до 150 μM у односу на Ru-2, да би на концентрацији од 300 μM оба рутенијумска комплекса испољила високу цитотоксичност према SW480 ћелијама. Оксалиплатина је довела до очигледног пада процентуалне заступљености вијабилних SW480 ћелија у поређењу са Ru-1 при већини и у односу Ru-2 при свим концентрацијама (Графикон 6).



Графикон 6. Вијабилност SW480 ћелија након 72-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, *Student's t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

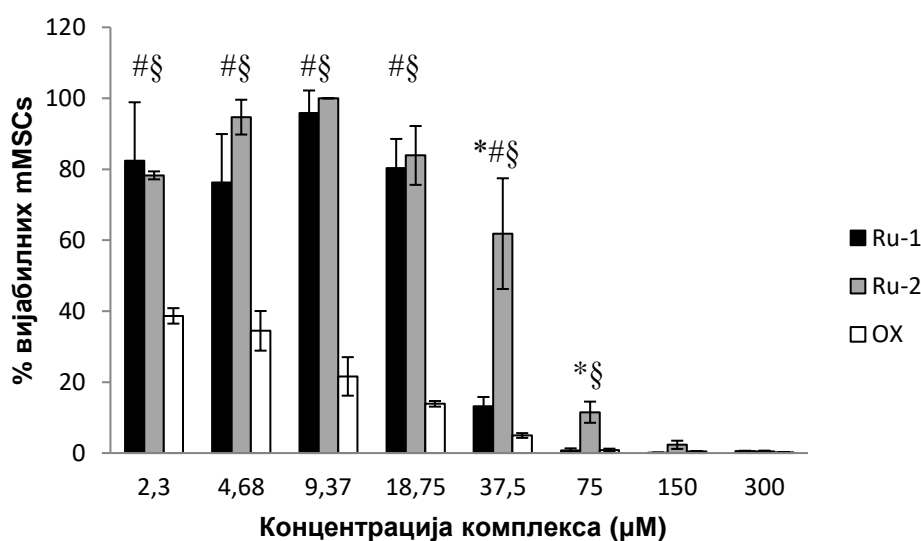
4.1.4. Рутенијум(II) терпиридин комплекси редукују вијабилност ћелија мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs

На **Графикону 7** је приказана осетљивост мезенхималних матичних ћелија миша на токсично дејство комплекса рутенијума(II). Након излагања мезенхималних матичних ћелија миша комплексу Ru-1 у трајању од 24 часа, уочено да долази до статистички значајног смањења вијабилности при концентрацијама 18,75 μM и 37,5 μM у односу на Ru-2 и при највишој испитиваној концентрацији у односу на оксалиплатину и Ru-2. Док је оксалиплатина постигла статистички значајан пад процента вијабилних мезенхималних матичних ћелија миша једино након примене концентрације - 18,75 μM у односу на Ru-2.



Графикон 7. Вијабилност мезенхималних матичних ћелија миша ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, *Student's t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

Након 72-часовног третмана мезенхималних матичних ћелија миша комплексима рутенијума и оксалиплатином, јасно се уочава да оксалиплатина показује статистички значајно смањење вијабилности мезенхималних матичних ћелија миша при нижим концентрацијама у односу на Ru-1 и Ru-2, да би се њихова цитотоксичност изједначила при вишим концентрацијама. Поређењем цитотоксичних ефеката које су испољили Ru-1 и Ru-2 на мезенхималне матичне ћелије миша, Ru-1 је довео до статистички значајног смањења вијабилности мезенхималних матичних ћелија миша при 37,5 μM и 75 μM у односу на Ru-2 (Графикон 8).



Графикон 8. Вијабилност мезенхималних матичних ћелија миша након 72-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређена МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, Student's *t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; \$ Ru-2 vs. OX).

Поређењем цитотоксичне активности испитиваних комплекса на ћелијама карцинома колона и мезенхималним матичним ћелијама миша које се деле брзо као и туморске ћелије али су туморски неизмењене уочава се да рутенијум(II) терпиридин комплекси делују слабије цитотоксично на мезенхималне матичне ћелије у поређењу са оксалиплатином, која чак и при најнижим примењеним концентрацијама делује веома цитотоксично на мезенхималне матичне ћелије миша. На основу IC_{50} вредности се види да рутенијум(II) терпиридин комплекси и оксалиплатина имају израженије цитотоксично дејство према мезенхималним матичним ћелијама миша него према СТ26 и SW480 ћелијама (Табела 2).

Табела 2. Концентрације рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине које инхибирају преживљавање ћелија за 50% након 24 и 72 сата инкубације.

| $IC_{50}(\mu M)$ | Ru-1 | Ru-2 | Оксалиплатина |
|------------------|-------------|--------------|----------------------|
| СТ26 | | | |
| 72 h | 50,9 ± 4,1 | 148,4 ± 11,2 | 25,2 ± 2,3 |
| 24 h | 43,3 ± 3,8 | 167,3 ± 12,7 | 54,5 ± 4,9 |
| НСТ116 | | | |
| 72 h | 19,1 ± 1,2 | 20,4 ± 1,8 | <2,3 |
| 24 h | 31,8 ± 2,7 | 50,4 ± 5,2 | 9,7 ± 8,1 |
| SW480 | | | |
| 72 h | 44,7 ± 4,5 | 86,4 ± 7,8 | 1,3 ± 0,2 |
| 24 h | 50,4 ± 4,8 | 156,1 ± 12,1 | 100,4 ± 9,8 |
| mMSC | | | |
| 72 h | 20,4 ± 2,1 | 32,1 ± 3,4 | <2,3 |
| 24 h | 17,8 ± 4,3 | 44,7 ± 4,4 | 19,8 ± 1,7 |

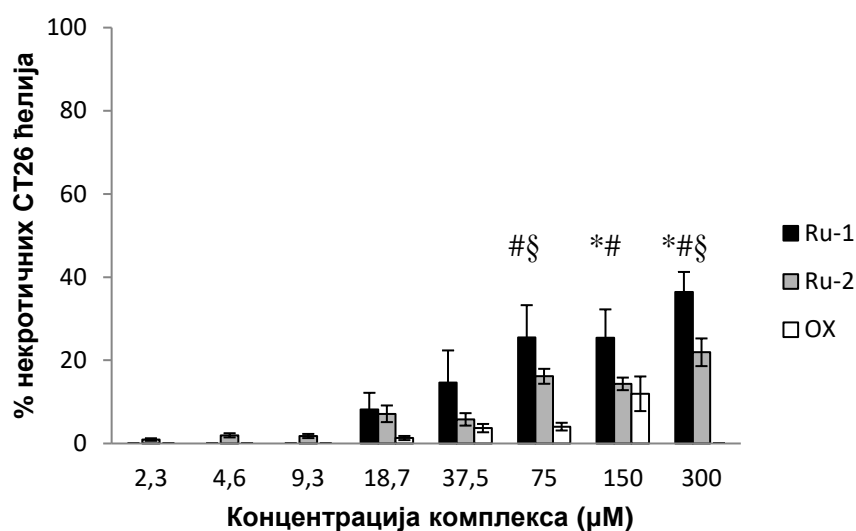
СТ26 - мишје ћелије карцинома колона; НСТ116 и SW480 - хумане ћелије карцинома колона; mMSC - мишје мезенхималне матичне ћелије. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату).

4.2. Резултати LDH теста

LDH тест се заснива на мерењу активности ензима лактат дехидрогеназе у медијуму у којем су ћелије култивисане. С обзиром на то да је LDH присутан само у цитоплазми ћелија, у медијуму се може детектовати тек након дезинтеграције ћелијске мембране, стога се LDH тест користи за детекцију некротске смрти ћелија.

4.2.1. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране карцинома колона миша - СТ26

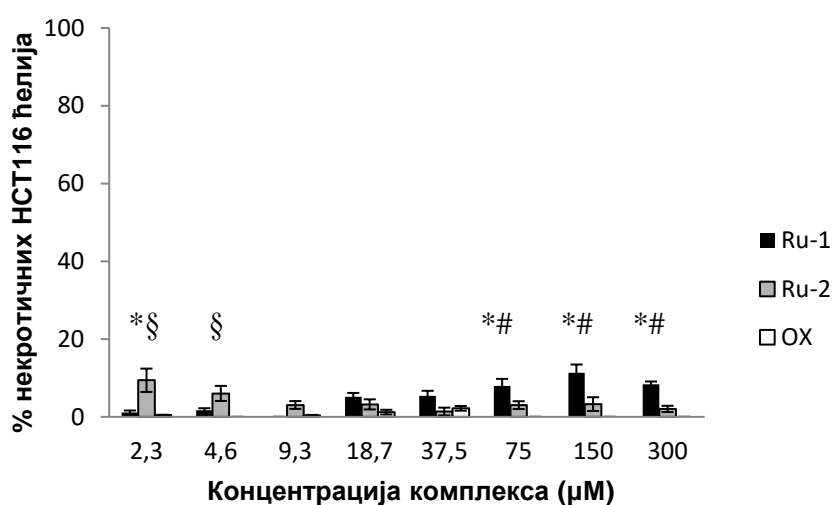
Добијени подаци LDH теста указују на значајно већи проценат некротичних СТ26 ћелија након 24-часовног третмана комплексима рутенијума(II) у односу на ћелије које су биле изложене оксалиплатини. Примена Ru-1 у опсегу концентрација од 2,3 μM до 300 μM индукује знатно већи пораст некротичних СТ26 ћелија (са 0% на 36,43%), у односу на примену Ru-2 (са 0,95% на 21,93%) који је још израженији у односу на третман оксалиплатином у истим концентрацијама (са 0% на 11,95%) (Графикон 9).



Графикон 9. Процент некротичних СТ26 ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређен LDH тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, *Student's t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. Ox; § Ru-2 vs. Ox).

4.2.2. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116

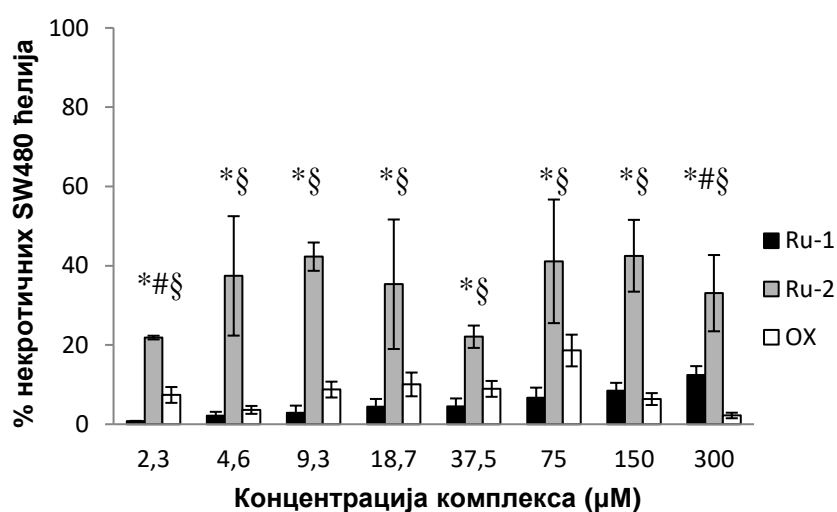
Анализа резултата LDH теста, након култивације НСТ116 ћелија са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у трајању од 24 часа, указује да оксалиплатина не доводи до некрозе НСТ116 ћелија, док испитивани комплекси рутенијума(II) индукују некрозу НСТ116 ћелија у ниском степену (~10%). Комплекс Ru-1 доводи до статистички значајно већег процента некрозе НСТ116 ћелија при вишим концентрацијама (75, 150 и 300 μM) у односу на Ru-2 и оксалиплатину. Док комплекс Ru-2 изазива статистички значајно већи процента некрозе НСТ116 ћелија при нижим концентрацијама у односу на Ru-1 и оксалиплатину (Графикон 10).



Графикон 10. Процент некротичних НСТ116 ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређен LDH тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, Student's *t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

4.2.3. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480

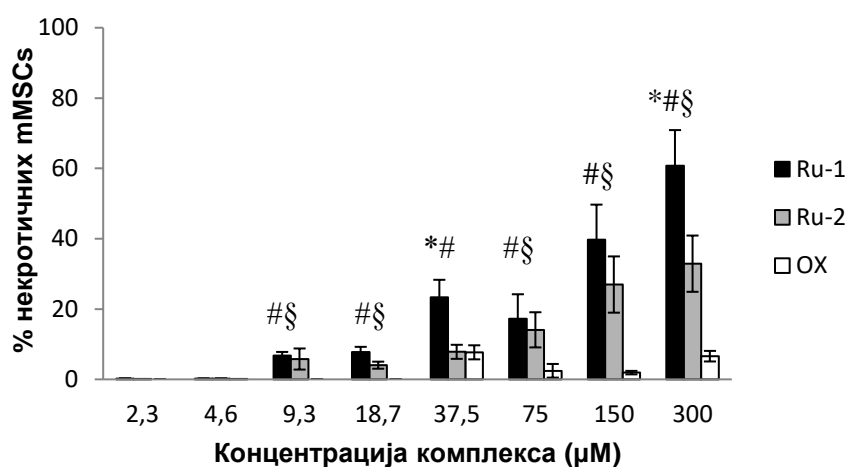
Након 24-часовне култивације SW480 ћелија са комплексима рутенијума(II) и оксалиплатином, уочава се да Ru-2 доводи до највећег степена некрозе SW480 ћелија, са статистичком значајношћу како при вишим, тако и при нижим концентрацијама у односу на Ru-1 и оксалиплатину. Док се након примене Ru-1 задржава низак проценат некротичних SW480 ћелија, који је дозно зависан и једино при највишој коришћеној концентрацији достиже статистички значајно виши процента некрозе SW480 ћелија у односу на ћелије третиране оксалиплатином (Графикон 11).



Графикон 11. Процент некротичних SW480 ћелија након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређен LDH тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, Student's *t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

4.2.4. Рутенијум(II) терпиридин комплекси утичу на интегритет ћелијске мембране мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs

Након 24-часовног третмана мезенхималних матичних ћелија миша комплексима рутенијума(II) и оксалиплатином, јасно се уочава да оксалиплатина не индукује некрозу, док комплекси рутенијума(II) доводе некрозе мезенхималних матичних ћелија миша при вишим концентрацијама. При чему примена Ru-1 у концентрацији од 2,3 μM до 300 μM доводи већег пораста мртвих ћелија (са 0,20% на 60,73%), у односу на Ru-2 (са 0,10% на 32,90%) (Графикон 12).



Графикон 12. Процент некротичних мезенхималних матичних ћелија миша након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином, одређен LDH тестом. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату, $p < 0,05$, Student's *t* тест, * Ru-1 vs. Ru-2; # Ru-1 vs. OX; § Ru-2 vs. OX).

4.3. Резултати теста за детекцију апоптозе (*Annexin V/PI*)

Након што смо МТТ и LDH тестом потврдили да испитивани комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност ћелијих линија карцинома колона, како мишјих тако и хуманих, наш следећи циљ у истраживању је био да се испита који тип ћелијске смрти туморских ћелија је доминантан након третирања рутенијум(II) комплексима и оксалиплатином. Методом бојења ћелија *Annexin V/PI*, одређен је проценат апоптотских и некротичних ћелија у популацији ћелија третираних испитиваним комплексима помоћу проточног цитометра.

4.3.1. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти ћелија карцинома колона миша - СТ26

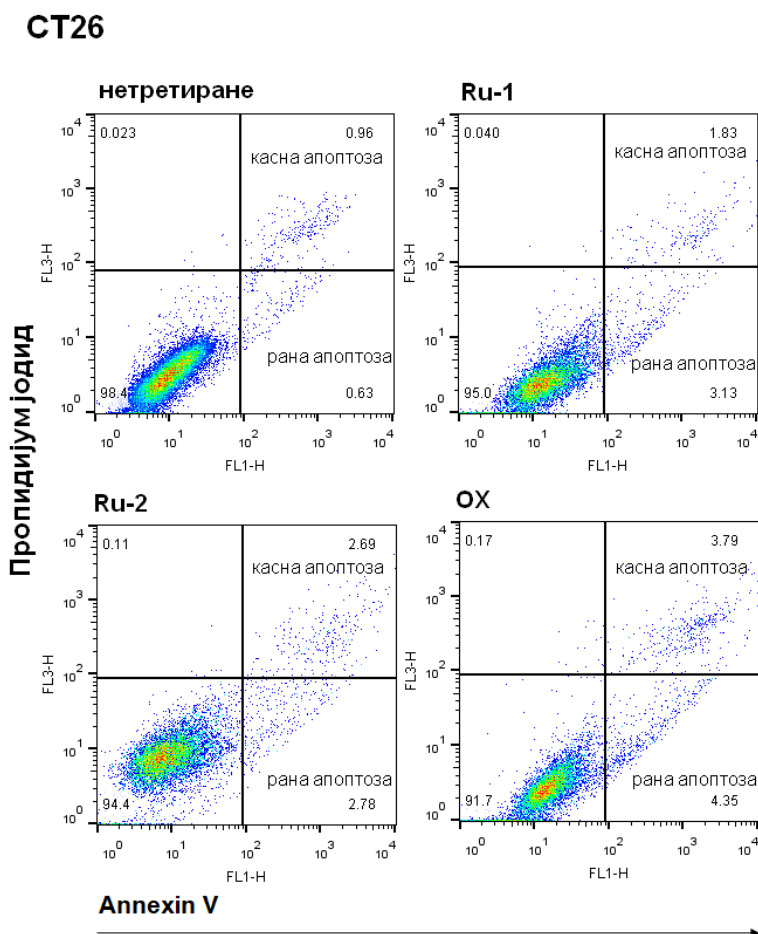
Након 24-часовног третирања испитиваних ћелија IC_{50} концентрацијама Ru-1, Ru-2 и оксалиплатине, ћелије су обележаване *Annexin V* који је коњугован са FITC-ом и PI и анализирани проточном цитометријом при чему је одређиван проценат вијабилних ћелија, ћелија у раној/касној апоптози и проценат некротичних ћелија.

Од укупног процента ћелија карцинома колона миша - СТ26, које нису третиране и стога служе као контрола: 98,4% је било вијабилно, свега 1,59% СТ26 ћелија је спонтано ушло у апоптозу, од тога је 0,63% било у стадијуму ране апоптозе, док је 0,96% ћелија је било у стадијуму касне апоптозе и свега 0,023% ћелија је било некротично.

Након 24-часовне инкубације СТ26 ћелија са IC_{50} концентрацијом комплекса Ru-1 (43,3 μM), вијабилних ћелија је било 95,0%, док је у фази ране апоптозе било 3,13% ћелија, а 1,83% у фази касне апоптозе и 0,04% ћелија је било некротично.

Слични резултати су добијени и након 24-часовне инкубације СТ26 ћелија са IC_{50} концентрацијом комплекса Ru-2 (167,3 μM). Детектовано је 94,4% вијабилних СТ26 ћелија, 2,78% ћелија је подлегло раној апоптози и 2,69% касној апоптози, док је 0,11% ћелија било некротично.

Након примена IC_{50} концентрације оксалиплатине (54,5 μM) у трајању од 24 часа, забележено је 91,7% вијабилних СТ26 ћелија, 4,35% ћелија је било у раној апоптози, а 3,79% ћелија у касној апоптози, док је некротичних ћелија је било 0,17% од укупне популације испитиваних ћелија (**Графикон 13**).



Графикон 13. Репрезентативни тачкасти дијаграми који илуструју утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на тип смрти СТ26 ћелија након 24-часовног третмана IC_{50} концентрацијама комплекса, (3 експеримента рађена у трипликату). Популација вијабилних ћелија (*Annexin V*^{-PI}), ћелије у раној апоптози (*Annexin V*^{+PI}), ћелије у касној апоптози (*Annexin V*^{+PI}) и некротичне ћелије (*Annexin V*^{-PI}).

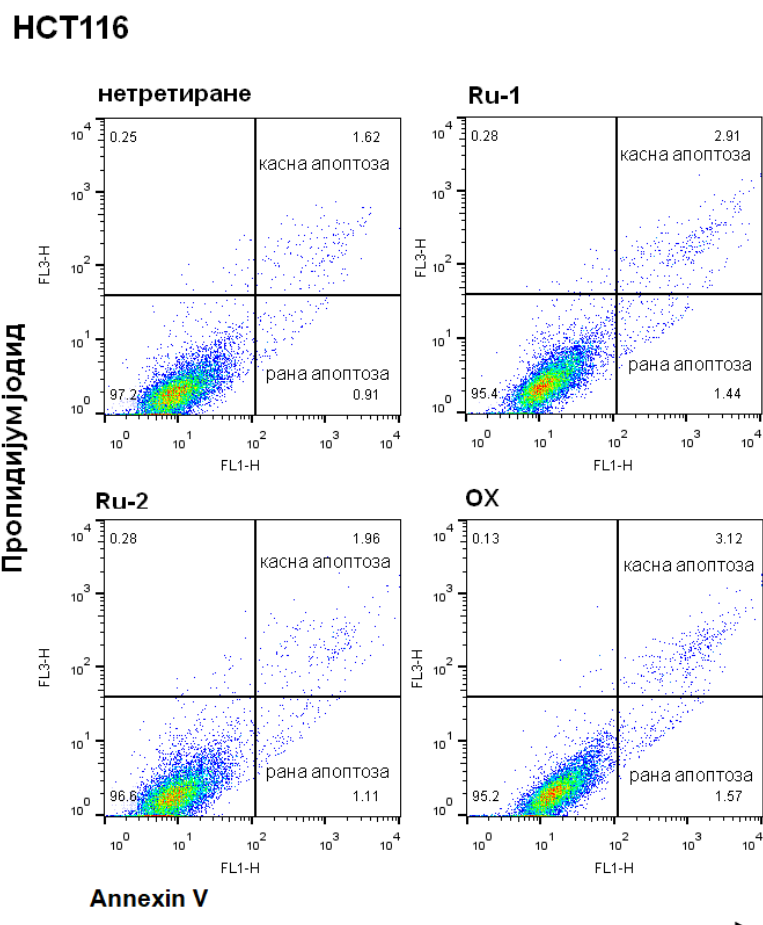
4.3.2. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116

Контролна популација нетретираних ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома НСТ116, након 24 часа инкубације у медијуму имала је 97,2% вијабилних ћелија, 2,53% је било укупно апоптотичних ћелија – од чега се 0,91% ћелија нашло раној апоптози, а 1,62% у касној апоптози, док је 0,25% ћелија било у стадијуму некрозе.

Након третирања НСТ116 ћелија IC_{50} концентрацијом Ru-1 комплекса (31,8 μM) у трајању од 24 сата, живих НСТ116 ћелија је било 95,4%, док је у фази ране апоптозе било 1,44% ћелија, а у фази касне апоптозе 2,91% и некротично их је било 0,28% ћелија.

Након излагања НСТ116 ћелија IC_{50} концентрацији Ru-2 комплекса (50,4 μM), детектовано је 96,6% вијабилних НСТ116 ћелија, 1,11% ћелија се нашло у раној апоптози, а 1,96% у касној апоптози и 0,28% ћелија је било некротично.

Након што су НСТ116 ћелије биле 24 сата изложене IC_{50} концентрацији оксалиплатине (9,7 μM), забележено је 95,2% вијабилних ћелија, 1,57% ћелија у раној апоптози, 3,12% ћелија у касној апоптози и 0,13% ћелија у фази некрозе (Графикон 14).



Графикон 14. Репрезентативни тачкасти дијаграми који илустрирају ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на тип смрти НСТ116 ћелија након 24-часовног третмана IC_{50} концентрацијама комплекса, (3 експеримента рађена у трипликату). Популација вијабилних ћелија (*Annexin V*^{-PI}), ћелије у раној апоптози (*Annexin V*^{+PI}), ћелије у касној апоптози (*Annexin V*^{+PI}) и некротичне ћелије (*Annexin V*^{-PI}).

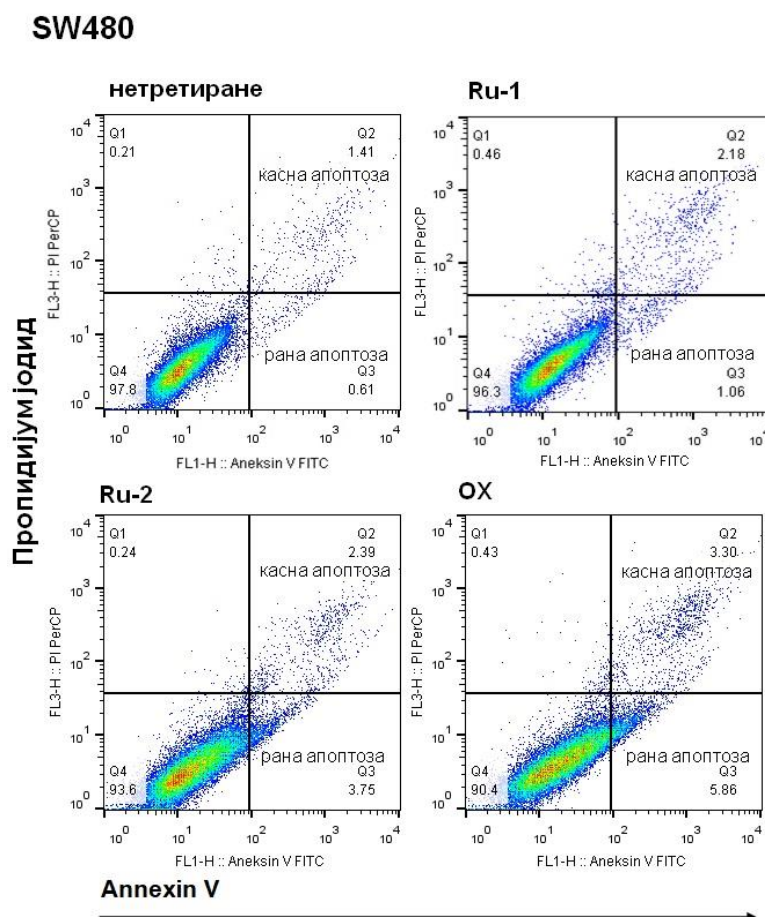
4.3.3. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480

У популација нетретираних ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома SW480, након 24 часа инкубације у медијуму било је 97,8% вијабилних ћелија, 2,02% ћелија је спонтано ушло у процес апоптозе, од чега 0,61% у рану апоптозу, а 1,41% у касну апоптозу, док је у фази некрозе било 0,21% ћелија.

Након излагања SW480 ћелија IC_{50} концентрацији Ru-1 (50,4 μM), детектовано је 96,3% вијабилних ћелија, 1,06% ћелија у раној апоптози, а 2,18% ћелија у фази касној апоптози и 0,46% ћелија је било некротично.

Након третирања IC_{50} концентрацијом Ru-2 комплекса (156,1 μM) у трајању од 24 сата, вијабилност SW480 ћелија је била 93,6%, док је у фази ране апоптозе било 3,75% ћелија, а у фази касне апоптозе 2,39% и некротично их је било 0,24% ћелија.

Након излагања SW480 ћелија IC_{50} концентрацији оксалиплатине (100,4 μM), забележено је 90,4% вијабилних ћелија, 5,86% ћелија у раној апоптози, 3,30% ћелија у касној апоптози и 0,43% ћелија у фази некрозе (Графикон 15).



Графикон 15. Репрезентативни тачкасти дијаграми који илуструју ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на тип смрти SW480 ћелија након 24-часовног третмана IC_{50} концентрацијама комплекса, (3 експеримента рађена у трипликату). Популација вијабилних ћелија (*Annexin V*⁻*PI*⁻), ћелије у раној апоптози (*Annexin V*⁺*PI*⁻), ћелије у касној апоптози (*Annexin V*⁺*PI*⁺) и некротичне ћелије (*Annexin V*⁻*PI*⁺).

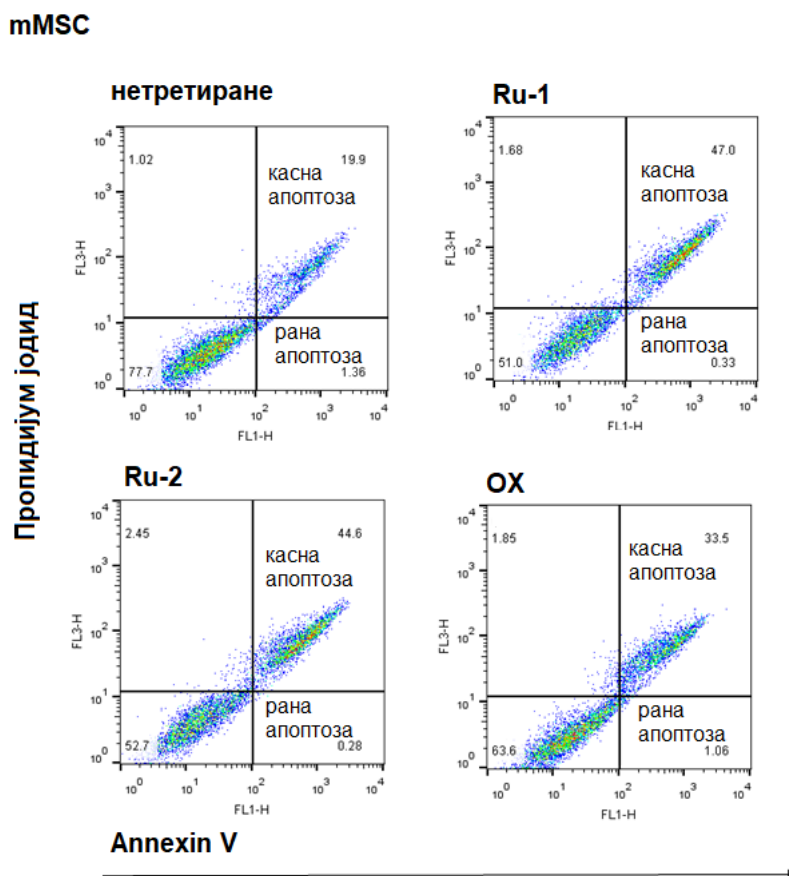
4.3.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на тип смрти мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs

Контролна популација нетретираних мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs, након 24 часа инкубације у медијуму имала је 77,7% вијабилних ћелија, 21,26% је било укупно апоптотичних ћелија – од чега се 1,36% ћелија нашло раној апоптози, а 19,9% у касној апоптози, док је 1,02% ћелија било у стадијуму некрозе.

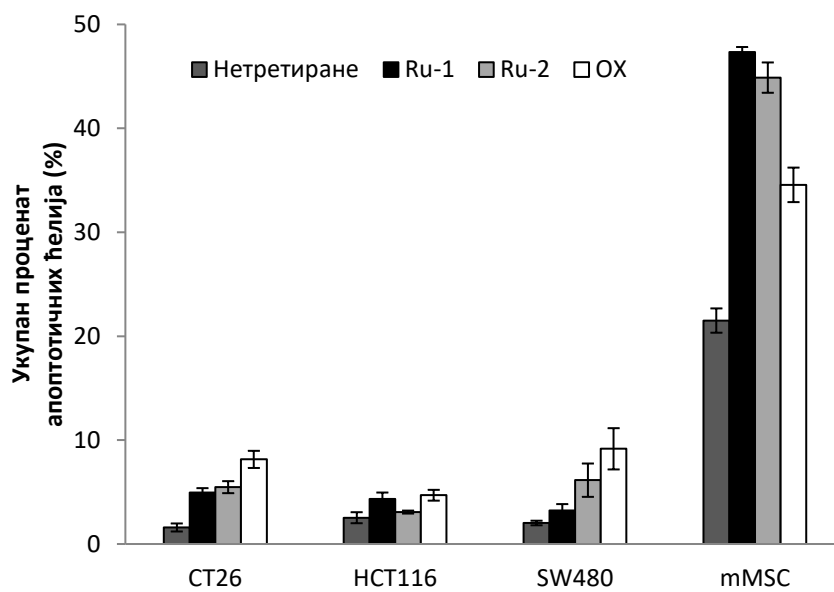
Након третирања mMSCs IC₅₀ концентрацијом Ru-1 комплекса (17,81 μM) у трајању од 24 сата, живих mMSCs је било 51%, док је у фази ране апоптозе било 0,33% ћелија, а у фази касне апоптозе 47% и некротично их је било 1,68% ћелија.

Након излагања mMSCs IC₅₀ концентрацији Ru-2 комплекса (44,70 μM), детектовано је 52,7% вијабилних mMSCs, 0,28% ћелија се нашло у раној апоптози, а 44,6% у касној апоптози и 2,45% ћелија је било некротично.

Након што су mMSCs биле 24 сата изложене IC₅₀ концентрацији оксалиплатине (19,88 μM), забележено је 63,6% вијабилних ћелија, 1,06% ћелија у раној апоптози, 33,5% ћелија у касној апоптози и 1,85% ћелија у фази некрозе (Графикон 16).



Графикон 16. Репрезентативни тачкасти дијаграми који илустрирају ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на тип смрти mMSCs након 24-часовног третмана IC₅₀ концентрацијама комплекса, (3 експеримента рађена у трипликату). Популација вијабилних ћелија (Annexin V⁻PI⁻), ћелије у раној апоптози (Annexin V⁺PI⁻), ћелије у касној апоптози (Annexin V⁺PI⁺) и некротичне ћелије (Annexin V⁻PI⁺).



Графикон 17. Процентуална заступљеност ћелија у фази апоптозе (рана и касна апоптоза заједно) након 24-часовне инкубације са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у одговарајућим IC₅₀ концентарцијама.

4.4. Резултати анализе ћелијског циклуса

Смањена вијабилности туморских ћелија које су третиране неким цитотоксичним агенсом може бити последица индукције апоптозе, некрозе и/или последица заустављања ћелијског циклуса [167].

Пошто је доказано да испитивани комплекси рутенијума(II) поседују цитотоксичну активност, следећи задатак је био да се испита утицај поменутих комплекса на ћелијски циклус, јер је управо заустављање ћелијског циклуса један од начина којим се постиже смањење вијабилности ћелија. Све испитиване ћелијске линије су инкубиране у периоду од 24 сата са IC₅₀ концентрацијама рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине, док су контролне ћелије биле изложене само свежем медијуму. Након тога су ћелије бојене пропиридијум јодидом и помоћу проточне цитометрије одређена је дистрибуција ћелијског циклуса третираних и нетретираних ћелија, односно добијена је процентуална заступљеност ћелија по фазама - G0/G1, S или G2/M. Приказани подаци су резултат три независна експеримента.

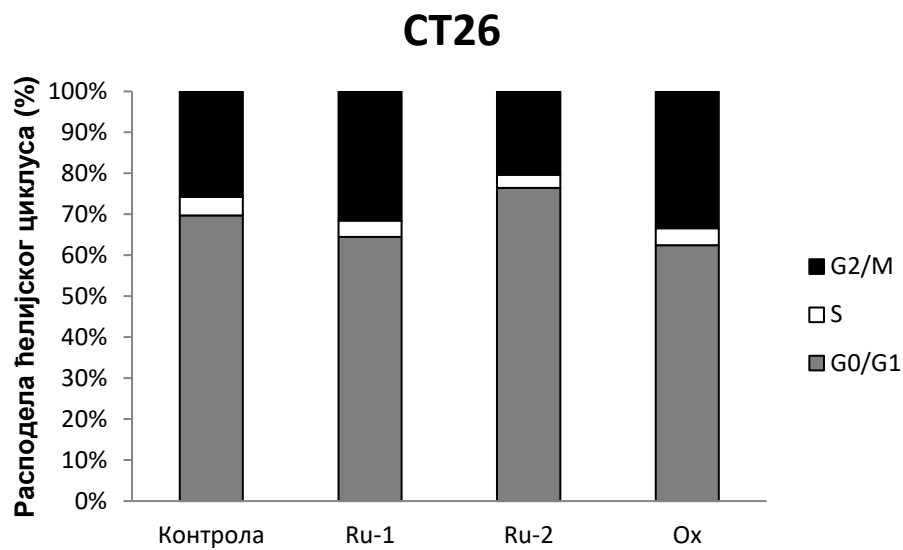
4.4.1. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса ћелија карцинома колона миша - CT26

Од укупног процента ћелија карцинома колона миша CT26, које су служиле као контрола, након 24 часа инкубације у хранљивом медијуму, у G0/G1 фази ћелијског циклуса се нашло 64,83% CT26 ћелија, 4,23% ћелија је било у S фази и 23,97% ћелија је било у G2/M фази ћелијског циклуса.

Инкубација CT26 ћелија са IC₅₀ концентрацијом Ru-1 комплекса у трајању од 24 сата, довела је до заустављања ћелијског циклуса CT26 ћелија у G2/M фази, због чега је проценат ћелија у овој фази био знатно виши у поређењу са контролом. Расподела CT26 ћелија по фазама ћелијског циклуса након 24-часовне инкубације са Ru-1 комплексом је следећа: 58,4% ћелија у G0/G1 фази, 3,65% ћелија у S фази и 28,53% ћелија у G2/M фази.

Након инкубације CT26 ћелија са IC₅₀ концентрацијом Ru-2 комплекса у трајању од 24 часа дошло је до заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 фази, чиме је значајно повећана проценатна заступљеност ћелија у G0/G1 фази и смањен проценат ћелија у G2/M и S фази у поређењу са контролним ћелијама. Стога је дистрибуција ћелијског циклуса CT26 ћелија након третмана Ru-2 комплексом била следећа: 71,2% ћелија у G0/G1 фази, 2,94%, у S фази и 18,96% у G2/M фази.

Примена IC₅₀ концентрације оксалиплатине у трајању од 24 часа је довела до застоја у G2/M фази ћелијског циклуса CT26 ћелија, тако да је процентуална заступљеност ћелија у G2/M фази значајно виша у односу на контролу. Након 24-часовне инкубације са оксалиплатином, удео CT26 ћелија у G0/G1 фази износио је 56,87%, у S фази је било 3,73% ћелија, а 30,4% ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса (Графикон 18).



Графикон 18. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на дистрибуцију ћелијског циклуса CT26 ћелија након 24-часовне инкубације. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату).

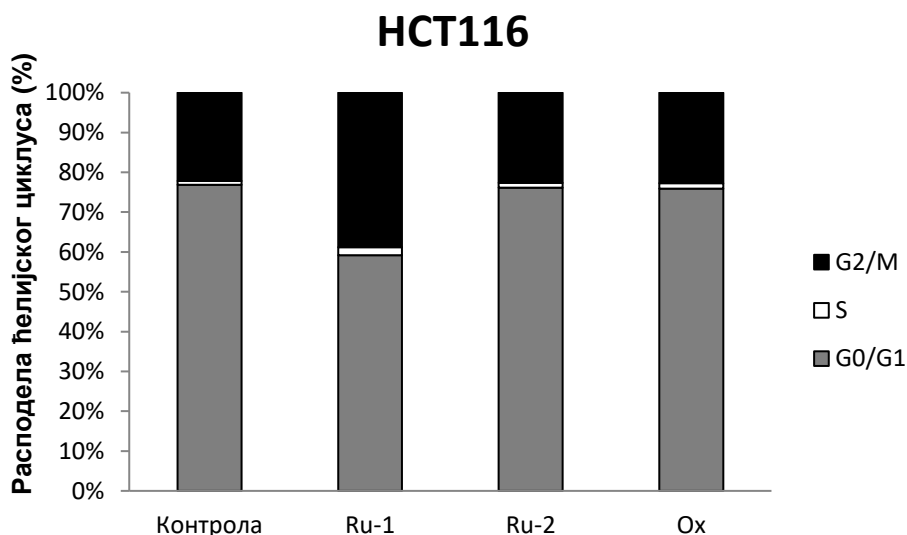
4.4.2. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома - НСТ116

Након 24 часа инкубације у хранљивом медијуму у популацији ћелија хуманог епителног колоректалног карцинома НСТ116, у *G0/G1* фази ћелијског циклуса било је 73,3% ћелија, 0,92% ћелија је било у *S* фази и 21,27% ћелија је било у *G2/M* фази ћелијског циклуса.

Инкубација НСТ116 ћелија са IC_{50} концентрацијом Ru-1 комплекса у трајању од 24 сата, довела је до застоја у *G2/M* фази, чиме је постигнута статистичка значајност у разлици процента ћелија у *G2/M* фази у поређењу са контролним ћелијама. Расподела НСТ116 ћелија по фазама ћелијског циклуса након 24-часовне инкубације са Ru-1 комплексом је следећа: 56,97% ћелија у *G0/G1* фази, 1,89% ћелија у *S* фази и 37,37% ћелија у *G2/M* фази.

Третмана НСТ116 ћелија IC_{50} концентрацијом Ru-2 комплекса у трајању од 24 сата није утицао значајно на дистрибуцију ћелијског циклуса НСТ116 ћелија. Процент НСТ116 ћелија по фазама ћелијског циклуса након 24-часовне инкубације са Ru-2 комплексом је следећи: у *G0/G1* фази је било 73,67% ћелија, у *S* фази је било 1,77%, а проценат ћелија у *G2/M* фази је износио 21,93%.

Примена IC_{50} концентрације оксалиплатине у трајању од 24 часа није значајно утицала на ћелијски циклус НСТ116 ћелија. Процентуална расподела ћелијског циклуса НСТ116 ћелија након 24-часовног третмана оксалиплатином је овако изгледала: 73,37% ћелија у *G0/G1* фази, 1,33% ћелија у *S* фази и 21,97% ћелија у *G2/M* фази (Графикон 19).



Графикон 19. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на дистрибуцију ћелијског циклуса НСТ116 ћелија 24-часовне инкубације. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату).

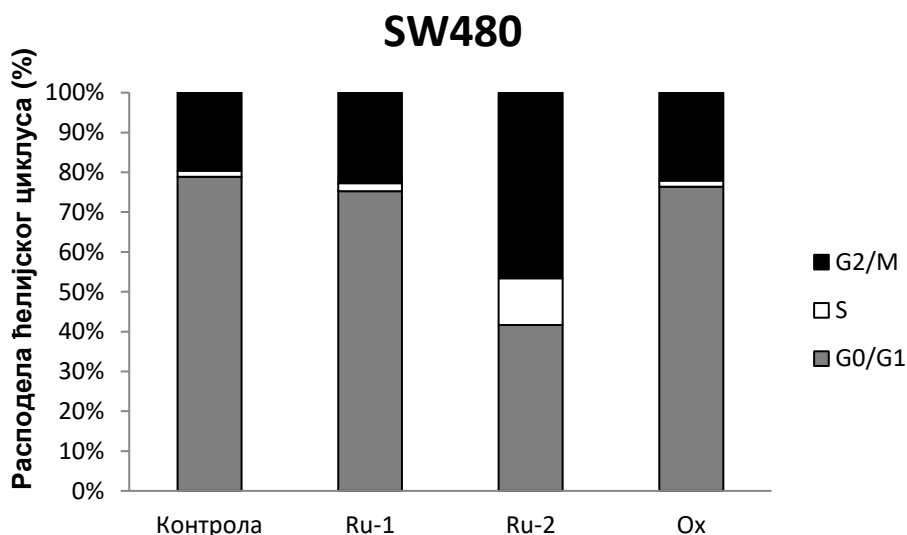
4.4.3. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома - SW480

Након 24 часа инкубације у хранљивом медијуму у популацији ћелија хуманог колоректалног аденокарцинома SW480, у *G0/G1* фази ћелијског циклуса било је 73,47% ћелија, 1,41% ћелија је било у *S* фази и 18,27% ћелија је било у *G2/M* фази ћелијског циклуса.

Инкубација SW480 ћелија са комплексом Ru-1 у концентрацији од 50,4 μM у трајању од 24 сата, није имала статистички значајног утицаја на расподелу ћелијског циклуса SW480 ћелија, тако да је у *G0/G1* фази било 69,5% ћелија, 1,82% ћелија у *S* фази и 21% ћелија у *G2/M* фази.

Након 24-часовног инкубирања SW480 ћелија са IC_{50} концентрацијом Ru-2 комплекса, дошло је до застоја у *G2/M* фази, што је довело до значајног повећања процентуалне заступљености ћелија у *G2/M* и *S* фази и смањења процента ћелија у *G0/G1* фази у поређењу са контролним ћелијама. Процентуална расподела по фазама ћелијског циклуса SW480 ћелија након инкубације са Ru-2 комплексом је следећа: у *G0/G1* фази је било 38,27% ћелија, у *S* фази 10,81%, а проценат ћелија у *G2/M* фази је износио 42,8.

Примена IC_{50} концентрације оксалиплатине у трајању од 24 сата није довела до промена у расподели ћелијског циклуса SW480 ћелија у односу на контролу. Стога је расподела SW480 ћелија по фазама ћелијског циклуса била следећа: у *G0/G1* фази је било 70,43% ћелија, у *S* фази се нашло 1,39% ћелија и 20,4% ћелија је било у *G2/M* фази (Графикон 20).



Графикон 20. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на дистрибуцију ћелијског циклуса SW480 ћелија након 24-часовне инкубације. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату).

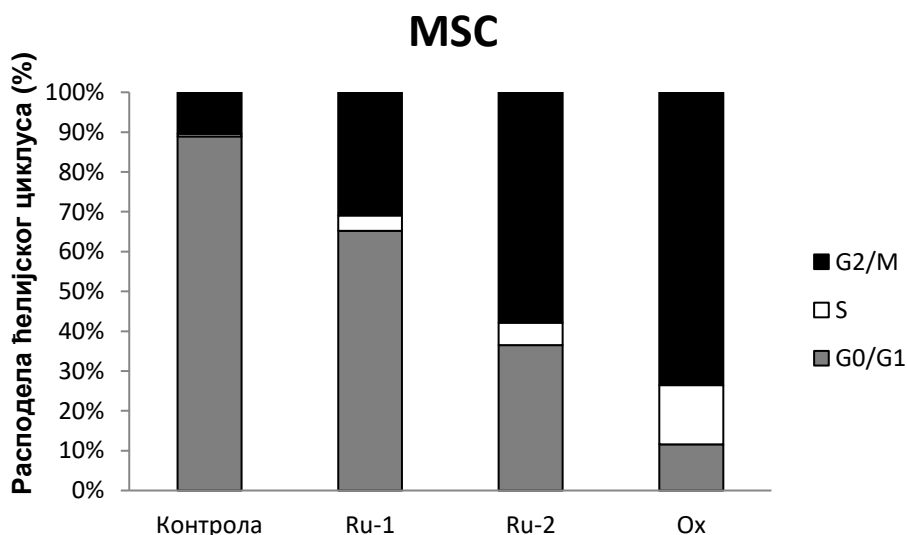
4.4.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса мезенхималних матичних ћелија миша - mMSCs

Популација нетретираних mMSCs, која је служила као контрола, након 24 часа инкубације у медијуму, имала је 86,93% ћелија у G0/G1 фази, у S фази је било 0,69% ћелија и 10,17% ћелија је било у G2/M фази ћелијског циклуса.

Инкубација mMSCs са IC₅₀ концентрацијом Ru-1 комплекса у трајању од 24 сата, узроковала је застој у G2/M фази и самим тим је дошло до значајног повећања процентуалне заступљености ћелија у G2/M и S фази у поређењу са контролним ћелијама. Дистрибуција mMSCs по фазама ћелијског циклуса након 24-часовне инкубације са Ru-1 комплексом је следећа: 62,37% ћелија у G0/G1 фази, 3,76% ћелија у S фази и 29,57% ћелија у G2/M фази.

Након третмана mMSCs са IC₅₀ концентрацијом Ru-2 комплекса у трајању од 24 сата, забележен је застој у G2/M фази, тако да је процентуална заступљеност ћелија у G2/M и S фази била значајно виша у односу на контролне ћелије. Процентуална расподела mMSCs по фазама ћелијског циклуса након 24-часовне инкубације са Ru-2 комплексом је следећа: у G0/G1 фази је било 34,67% ћелија, 5,41% у S фази и проценат ћелија у G2/M фази је износио 54,97.

Третирање mMSCs IC₅₀ концентрацијом оксалиплатине у трајању од 24 часа узрокује застој у G2/M фази ћелијског циклуса, тако да је процентуална заступљеност ћелија у G2/M и S фази значајно виша и пропорционално нижа у G0/G1 фази у поређењу са контролним ћелијама. Након третмана оксалиплатином 11,5% mMSCs је било у G0/G1 фази, у S фази - 14,8% и 73,23% ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса (Графикон 21).



Графикон 21. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на дистрибуцију ћелијског циклуса mMSCs након 24-часовне инкубације. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација (3 експеримента рађена у трипликату).

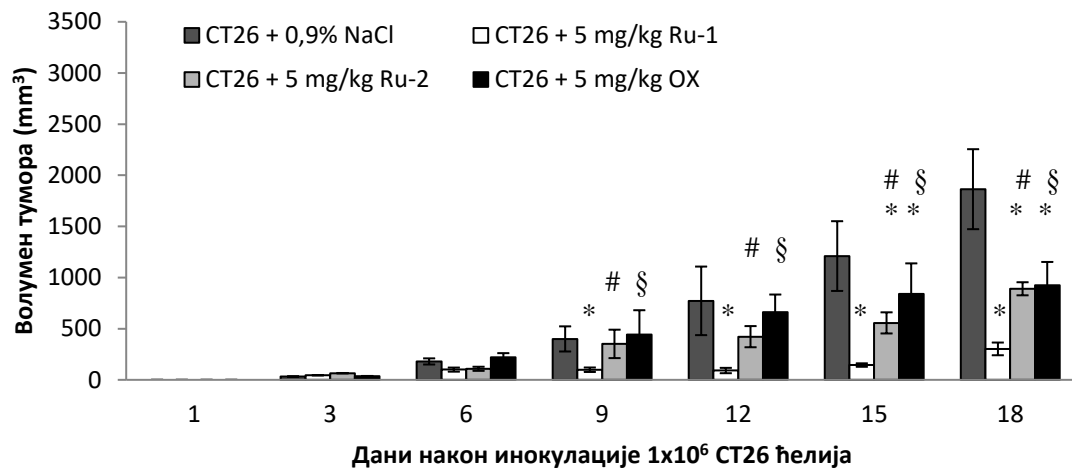
4.5. Антитуморски ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса *in vivo*

Пошто смо показали да комплекси рутенијума(II) имају цитотоксични ефекат на ћелије карцинома колона, како хуманог, тако и мишјег карцинома, наше наредно истраживање се односило на испитивање антитуморске активности рутенијум(II) терпиридин комплекса *in vivo*.

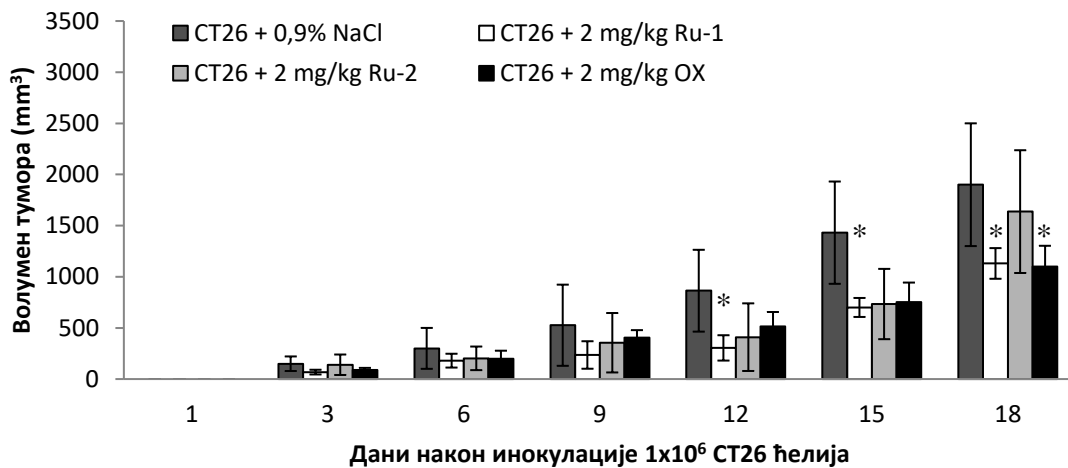
Као експериментални модел користили смо модел ектопичног туморског ксенографта карцинома колона, изазваног субкутаном апликацијом СТ26 ћелијске линије у леву дорзолумбалну регију BALB/с миша. Након шест дана од инокулације туморских СТ26 ћелија, мишевима су интраперитонеално апликовани испитивани комплекси у дози 2 и 5 mg/kg телесне масе, као референтна супстанца коришћена је оксалиплатина у истој дози, а као контролна супстанца стерилни физиолошки раствор. Протокол третирања мишева подразумевао је примену укупно 4 дозе, и то 6. дана, 9. дана, 12. дана, и 15. дана експеримента, а мишеви су жртвовани 18. дана експеримента, односно 72 часа од последње апликоване дозе (**Схема 3**).

Комплекс Ru-1 у дози од 5 mg/kg је супримирао раст тумора већ након прве дозе и тај ефекат је задржан до краја експеримента. Волумен тумора мишева третираних са 5 mg/kg Ru-1 је био значајно мањи већ 9. дана од инокулације СТ26 ћелија у односу на контролну групу. Разлика у волумену тумора између мишева који су примали 5 mg/kg Ru-1 и свих осталих група је задржана до краја експеримента, тако да је након друге апликоване дозе успостављена статистички значајна разлика како у односу на контролу, тако и у односу на други комплекс рутенијума(II) - Ru-2, али и у односу на оксалиплатину. До 15. дана експеримента је и Ru-2 комплекс статистички значајно ихибирао раст тумора у односу на контролу. Процент инхибиције раста тумора (енгл. *Tumor Growth Inhibition* – TGI) израчунат је према формули, $TGI(\%) = (V_c - V_t) / (V_c - V_o) * 100$, где су V_c , V_t - средње вредности волумена тумора контролне и третиране групе последњег дана експеримента и V_o - средња вредност волумена тумора на почетку експеримента (први дан апликације испитиваних супстанци). Последњег дана експеримента, све експерименталне групе су имале статистички значајно мањи волумен тумора у односу на контролну групу која је третирана само физиолошким раствором (**Графикон 22А, Табела 3**). Следећи *in vivo* експеримент спроведен је по истом протоколу, само су примењене дозе комплекса биле ниже, односно сви комплекси су примењени у дози од 2 mg/kg. Уочено је да комплекси рутенијума(II) примењени у дози од 2 mg/kg, имају слабији туморицидни ефекат у поређењу са ефектом који постижу када се примене у дози од 5 mg/kg, што није био случај са оксалиплатином, која је постигла приближно исте резултате у обе дозе. Међутим и поред тога, инхибиторни ефекат на раст тумора који су остварили комплекси рутенијума(II) су били компарабилни са ефектима оксалиплатине до 15. дана експеримента, али се последњег дана експеримента та једнакост у учинку губи између група које су примале Ru-2 и оксалиплатину, али се задржава за Ru-1 групу. Тако да је примена комплекса Ru-1 у дози од 2 mg/kg инхибирала раст хетеротопског карцинома колона подједнако добро као и оксалиплатина (**Графикон 22Б, Табела 3**).

А



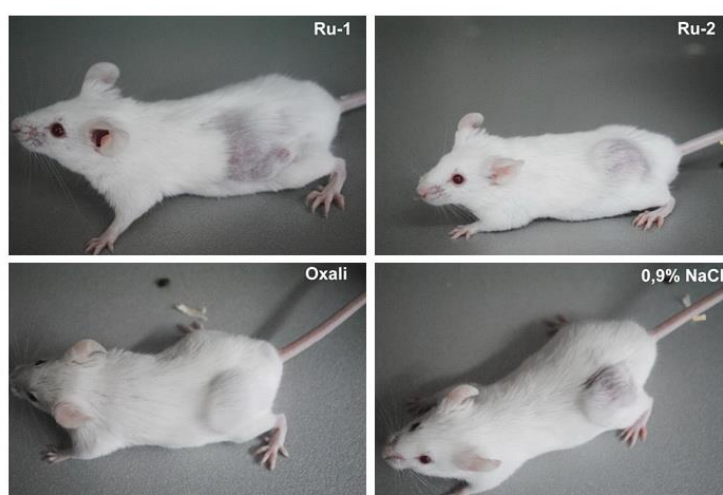
Б



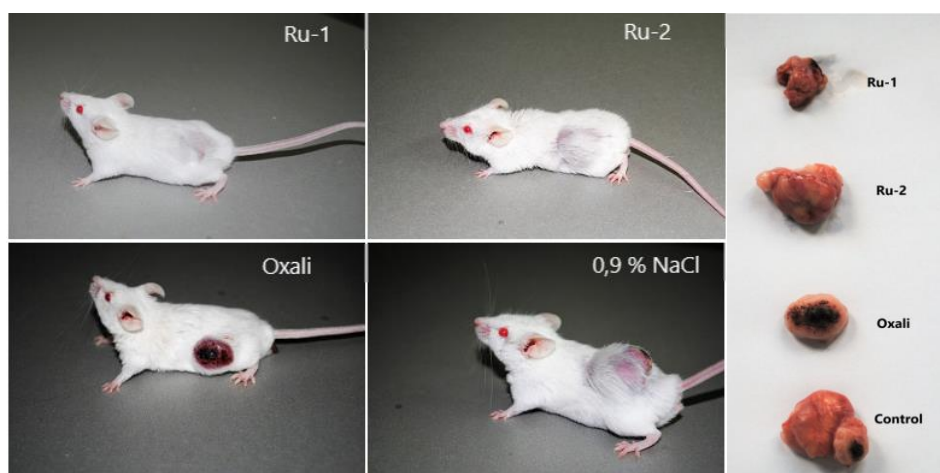
Графикон 22. Волумен тумора мишева третираних рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у дози од (А) 5 mg/kg и (Б) 2 mg/kg, кроз дане експеримента. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирану физиолошким раствором vs. мишеви третирану са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином; # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

Табела 3. Процент инхибиције раста тумора

| Инхибиција раста тумора (%) | | | |
|-----------------------------|-------|-------|-------|
| Доза \ Комплекс | Ru-1 | Ru-2 | Ox |
| 5 mg/kg | 92,72 | 57,81 | 55,69 |
| 2 mg/kg | 51,39 | 17,56 | 53,41 |



Слика 4. Оригинална слика – BALB/c мишеви са индукованим хетеротопским карциномом колона након третирања рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у дози од 5 mg/kg и контролна група мишева третирана физиолошким раствором.

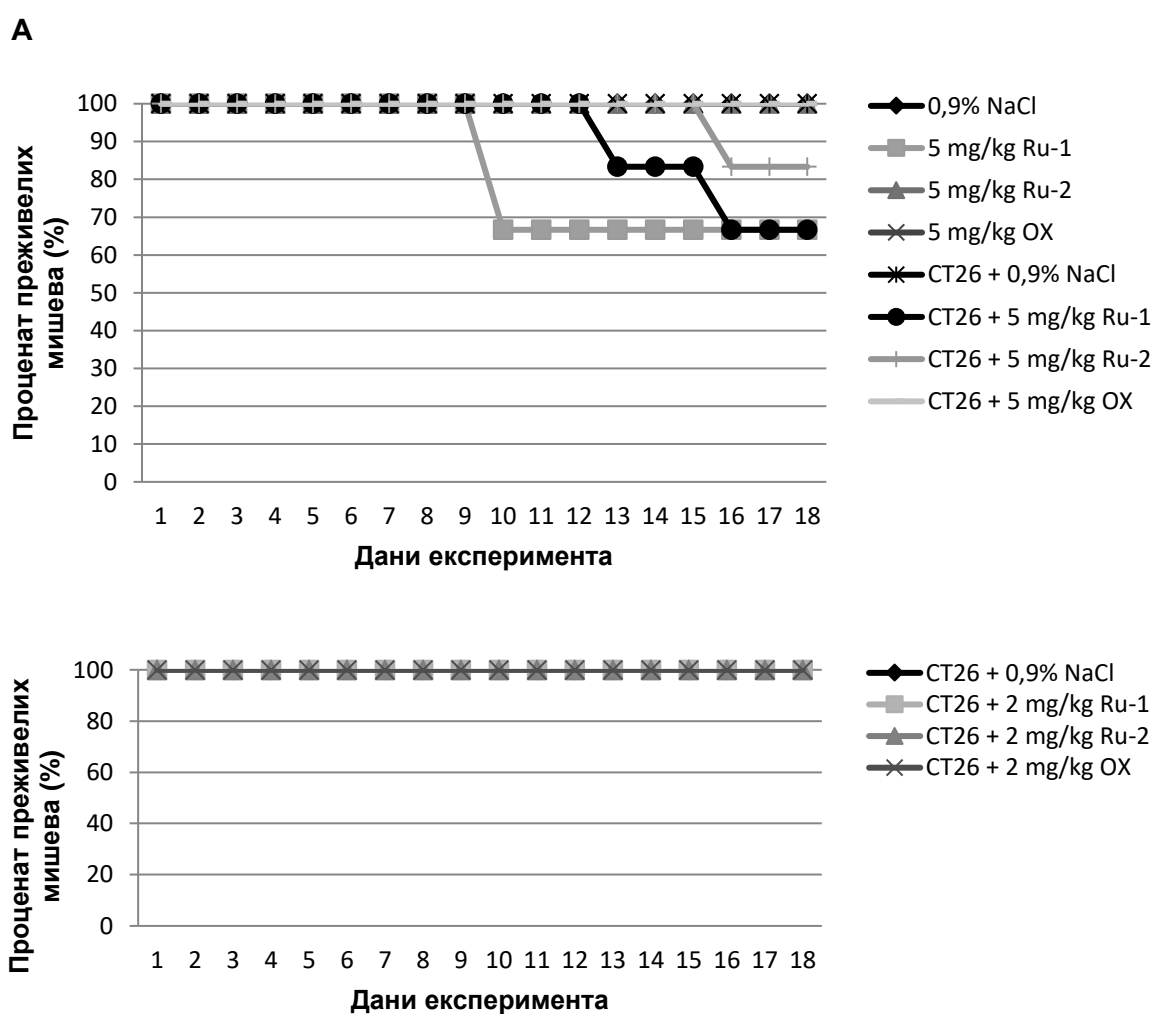


Слика 5. Оригинална слика – BALB/c мишеви са индукованим хетеротопским карциномом колона након третирања рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у дози од 2 mg/kg и контролна група мишева третирана физиолошким раствором.

4.6. Евалуација системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса

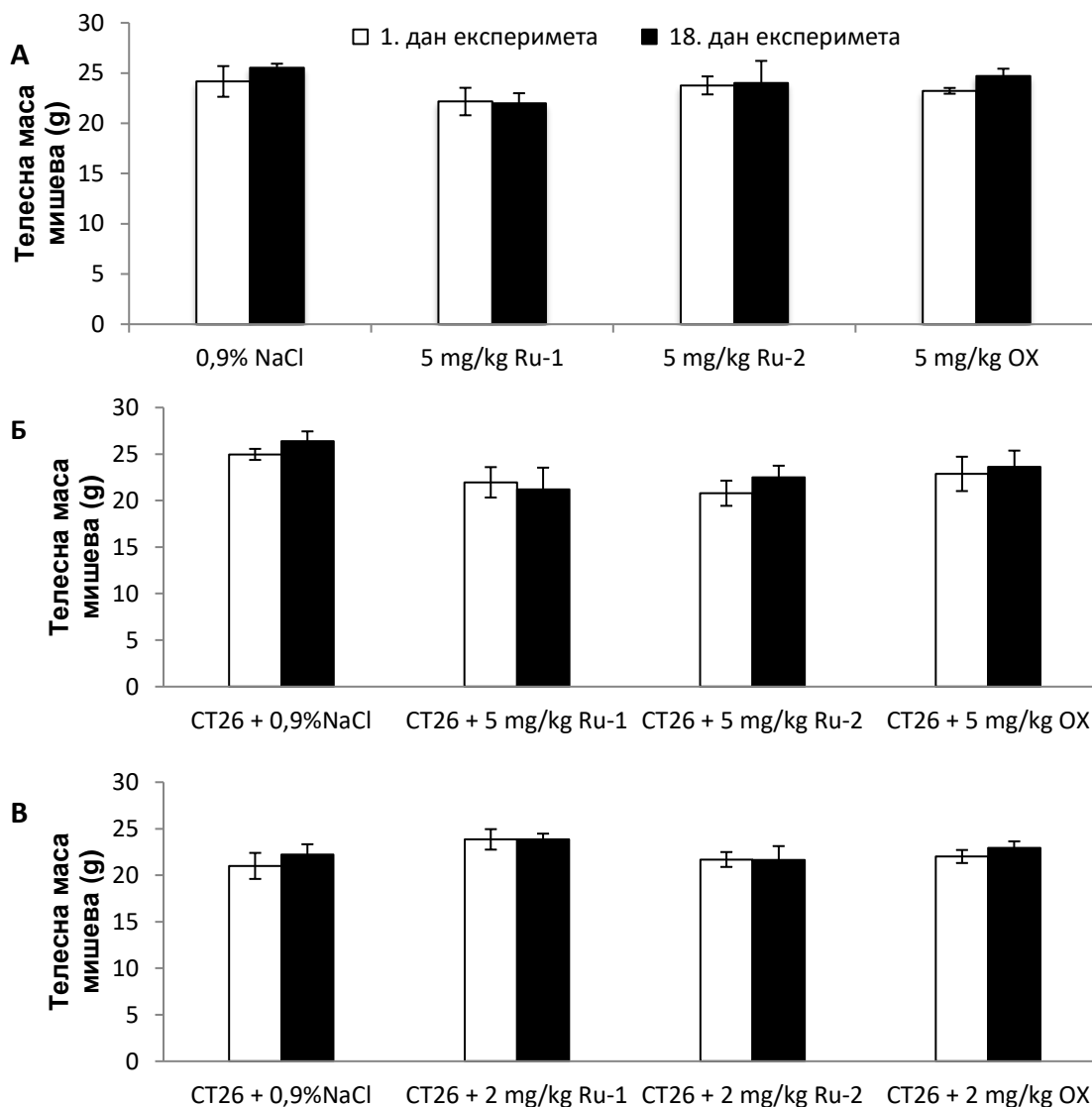
4.6.1. Преживљавање и телесна маса мишева

Примена комплекса рутенијума(II) у дози од 5 mg/kg је утицала на преживљавање, док је код мишева који су примали интраперитонеално оксалиплатину, стопа преживљавања била сто посто. Најнижи проценат преживелих мишева (66,67%) последњег дана експеримента је био у групи мишева који су примали интраперитонеално Ru-1 у дози од 5 mg/kg, како код здравих тако и код мишева са тумором. Након последње дозе од 5 mg/kg Ru-2 у групи мишева са тумором, проценат преживелих мишева је износио 83,33% (Графикон 23А). Док је стопа преживљавања износила 100% у свим групама мишева третираних са 2 mg/kg испитиваних комплекса (Графикон 23Б).



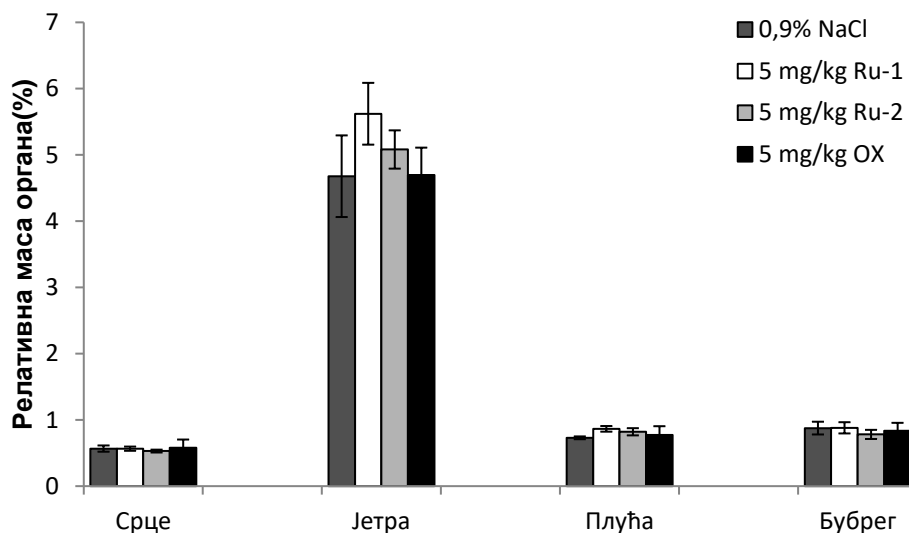
Графикон 23. Процент преживелих мишева по групама кроз дане експеримента. (А) Здрави мишеви и мишеви са индукованим СТ26 тумором третирају се са рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у дози од 5 mg/kg. (Б) Мишеви са индукованим СТ26 тумором третирају се са рутенијума(II) терпиридин комплексима и оксалиплатином у дози од 2 mg/kg.

Примена испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине није статистички значајно утицала на промену масе мишева. Комплекс Ru-1 у дози од 5 mg/kg је довео до благог пада телесне масе, како код здравих, тако и код мишева са тумором, а оба комплекса рутенијума у дози од 2 mg/kg су довела до стагнације телесне масе мишева (Графикони 24).



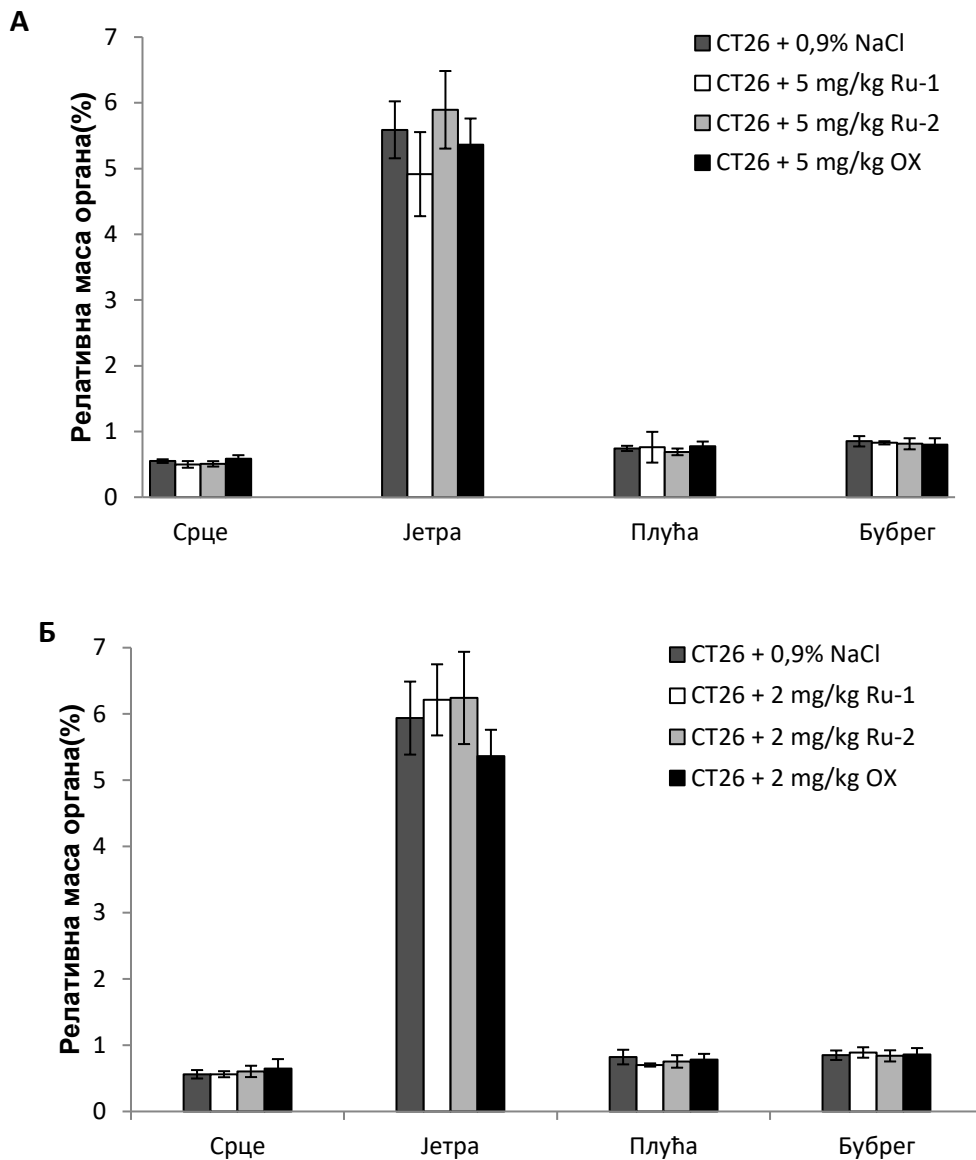
Графикон 24. Телесна маса (А) здравих мишева и (Б) мишева са индукованим СТ26 тумором пре и после примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. (В) Телесна маса мишева са индукованим СТ26 тумором пре и после примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 2 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, 12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$.

Приликом жртвовања мишева, изоловани и измерени су следећи органи: срце, јетра, плућа, бубрег, као и примарна туморска маса. Како би било могуће упоредити масе појединих органа, представљене су релативне масе које представљају количник апсолутне масе органа и телесне масе миша, изражене процентуално. Посматрањем релативних маса органа здравих мишева који су интраперитонеално примали комплексе рутенијума(II), оксалиплатину или физиолошки раствор, запажа се да није било разлике у релативној маси изолованих органа између група. Међутим, у обе групе мишева који су интраперитонеално примали комплексе рутенијума(II) је забележена нешто већа релативна маса јетре у односу на мишеве који су примали физиолошки раствор, али без статистичке значајности (**Графикон 25**).



Графикон 25. Релативна маса изолованих органа здравих мишева након примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, 12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$.

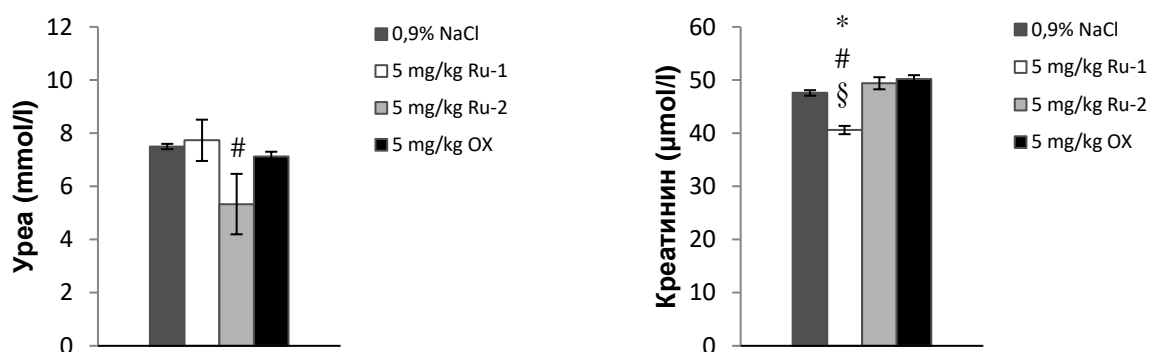
Поређењем релативних маса органа мишева са индукованим тумором који су интраперитонеално примали комплексе рутенијума(II), оксалиплатину или физиолошки раствор, уочава се да није било разлика у релативној маси изолованих органа између група (Графикон 26).



Графикон 26. Релативна маса изолованих органа мишева са тумором након примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од (А) 5 mg/kg и (Б) 2 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, 12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$.

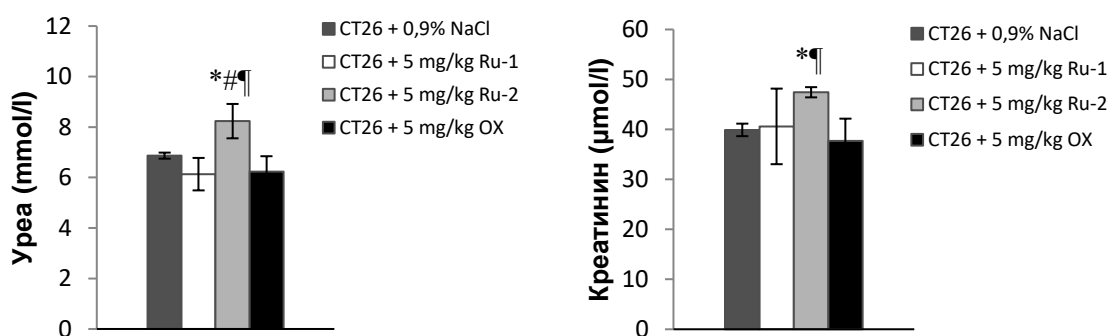
4.6.2. Процена нефротоксичности рутенијум(II) терпиридин комплекса

Ради процене очуваности функције бубрега одређивана је концентрација урее и креатинина у серуму здравих мишева који су примали интраперитонеално комплексе рутенијума(II), оксалиплатину или физиолошки раствор у различитим дозама (2 mg/kg и 5 mg/kg). Добијене серумске вредности урее и креатинина указују на то примена комплекса рутенијума(II) и оксалиплатине у дози од 5 mg/kg није утицала на повећање концентрација урее нити креатинина у односу на групу мишева који су примали интраперитонеално физиолошки раствор. Чак су забележене статистички значајно ниже концентрације урее у групи која је примала интраперитонеално 5 mg/kg Ru-2 у односу на групу мишева који су примали интраперитонеално 5 mg/kg Ru-1. Такође су забележене статистички значајно ниже концентрације креатинина у групи која је примала интраперитонеално 5 mg/kg Ru-1 у односу на све друге групе (**Графикон 27**).



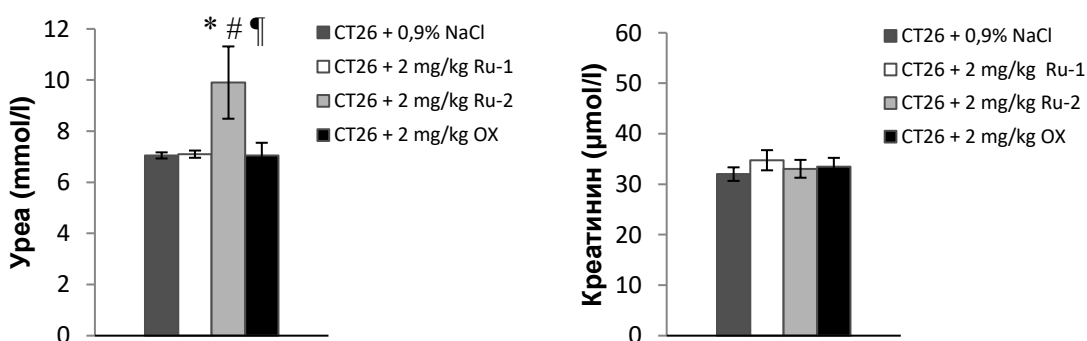
Графикон 27. Концентрација урее и креатинина у серуму здравих мишева након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирану физиолошким раствором vs. мишеви третирану са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; † Ru-2 vs. OX).

Концентрација уреe и креатинина у серуму мишева са тумором након примене испитиваних комплекса у дози од 5 mg/kg су биле нешто другачије. Тачније, група мишева која је примали интраперитонеално Ru-2 је имала статистички значајно више концентрације уреe у односу на све остале групе и статистички значајно више концентрације креатинина у односу на групе мишева који су примали интраперитонеално оксалиплатину или физиолошки раствор (**Графикон 28**).



Графикон 28. Концентрација уреe и креатинина у серуму мишева са тумором након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

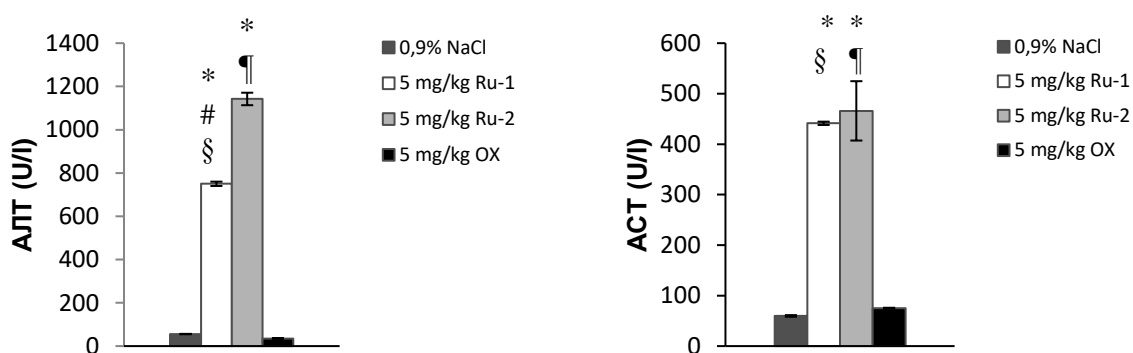
Група мишева са тумором која је примали интраперитонеално 2 mg/kg Ru-2 је имала статистички значајно више концентрације уреe у односу на све остале групе, док се вредности крaтинина нису статистички значајно разликовале између група (**Графикон 29**).



Графикон 29. Концентрација уреe и креатинина у серуму мишева са тумором након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 2 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

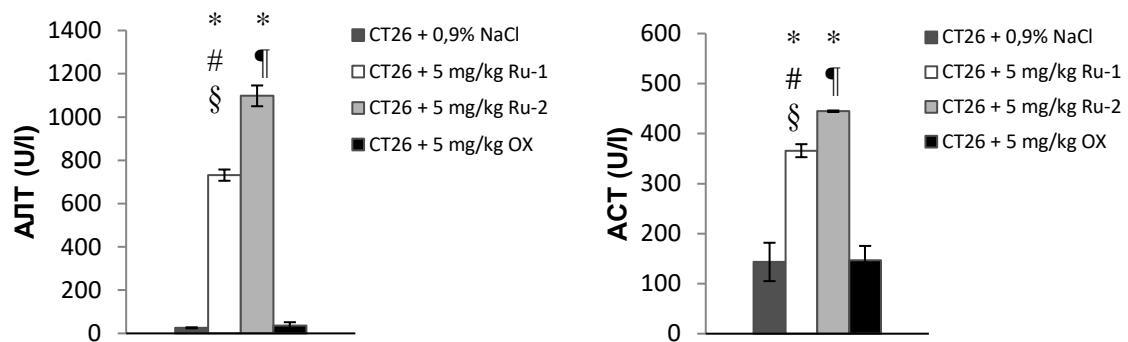
4.6.3. Процена хепатотоксичности рутенијум(II) терпиридин комплекса

Ради процене очуваности функције јетре одређивана је активност трансаминаза (АЛТ и АСТ) у серуму здравих мишева након интраперитонеалне примене комплекса рутенијума(II), оксалиплатине или физиолошког раствора у различитим дозама (2 mg/kg и 5 mg/kg). Добијене вредности АЛТ и АСТ јасно указују да интраперитонеална примена комплекса рутенијума(II) у дози од 5 mg/kg доводи до статистички значајног скока вредности ова два параметра. Група мишева која је интраперитонеално примала 5 mg/kg Ru-2 је имала статистички значајно више концентрације АЛТ у односу на све остале групе, и статистички значајно више концентрације АСТ у односу на мишеве који су интраперитонеално примали оксалиплатину или физиолошки раствор. Мишеви који су интраперитонеално примали 5 mg/kg Ru-1 имали су статистички значајно више концентрације АЛТ и АСТ у односу на мишеве који су интраперитонеално примали оксалиплатину или физиолошки раствор. Није било разлике у вредностима АЛТ и АСТ између групе која је интраперитонеално примала 5 mg/kg оксалиплатине у односу на групу која је интраперитонеално примала физиолошки раствор (Графикон 30).



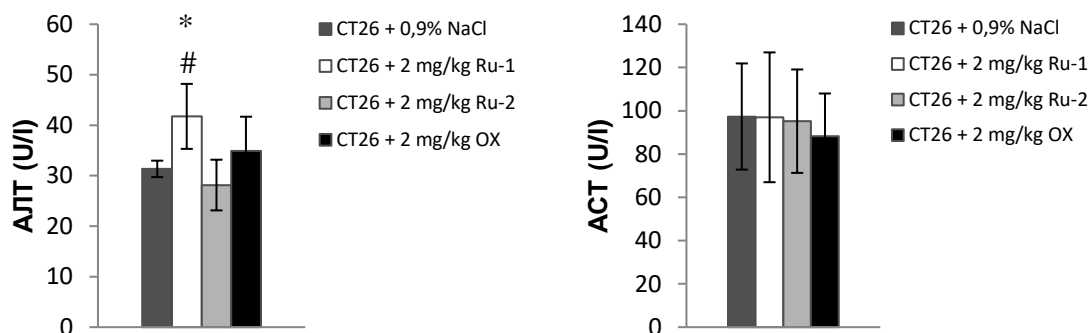
Графикон 30. Концентрација трансаминаза (АЛТ и АСТ) у серуму здравих мишева након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

Сличан тренд је задржан и код мишева са тумором који су интраперитонеално примали комплексе рутенијума(II), оксалиплатину или физиолошки раствор у дози од 5 mg/kg. Група мишева која је интраперитонеално примала 5 mg/kg Ru-2 је имала статистички значајно више концентрације АЛТ и АСТ у односу на све остале групе. Мишеви који су интраперитонеално примали 5 mg/kg Ru-1 имали су статистички значајно више концентрације АЛТ и АСТ у односу на мишеве који су интраперитонеално примали оксалиплатину или физиолошки раствор. Није било разлике у вредностима АЛТ и АСТ између групе која је интраперитонеално примала 5 mg/kg оксалиплатине у односу на групу која је интраперитонеално примала физиолошки раствор (Графикон 31).



Графикон 31. Концентрација трансминаза (АЛТ и АСТ) у серуму мишева са тумором након примене испитиваних рутенијума(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

Група мишева са тумором која је интраперитонеална примала 2 mg/kg Ru-1 је имала статистички значајно више концентрације АЛТ у односу на групе које су примале Ru-1 или оксалиплатину. Није било разлике у вредностима АЛТ између групе која је интраперитонеално примала 2 mg/kg оксалиплатине у односу на групу која је интраперитонеално примала физиолошки раствор. Такође, вредности АСТ се нису значајно разликовале између група (Графикон 32).



Графикон 32. Концентрација трансаминаза (АЛТ и АСТ) у серуму мишева са тумором након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 2 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

4.6.4. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на време до реакције у тесту вруће плоче (процена неуротоксичности)

За време трајања теста (60 секунди) нису забележене карактеристичне реакције на термални стимулус (лизанье задње шапице, трешење задње шапице или одскакивање од подлоге) код третираних група мишева, али ни код контролне групе.

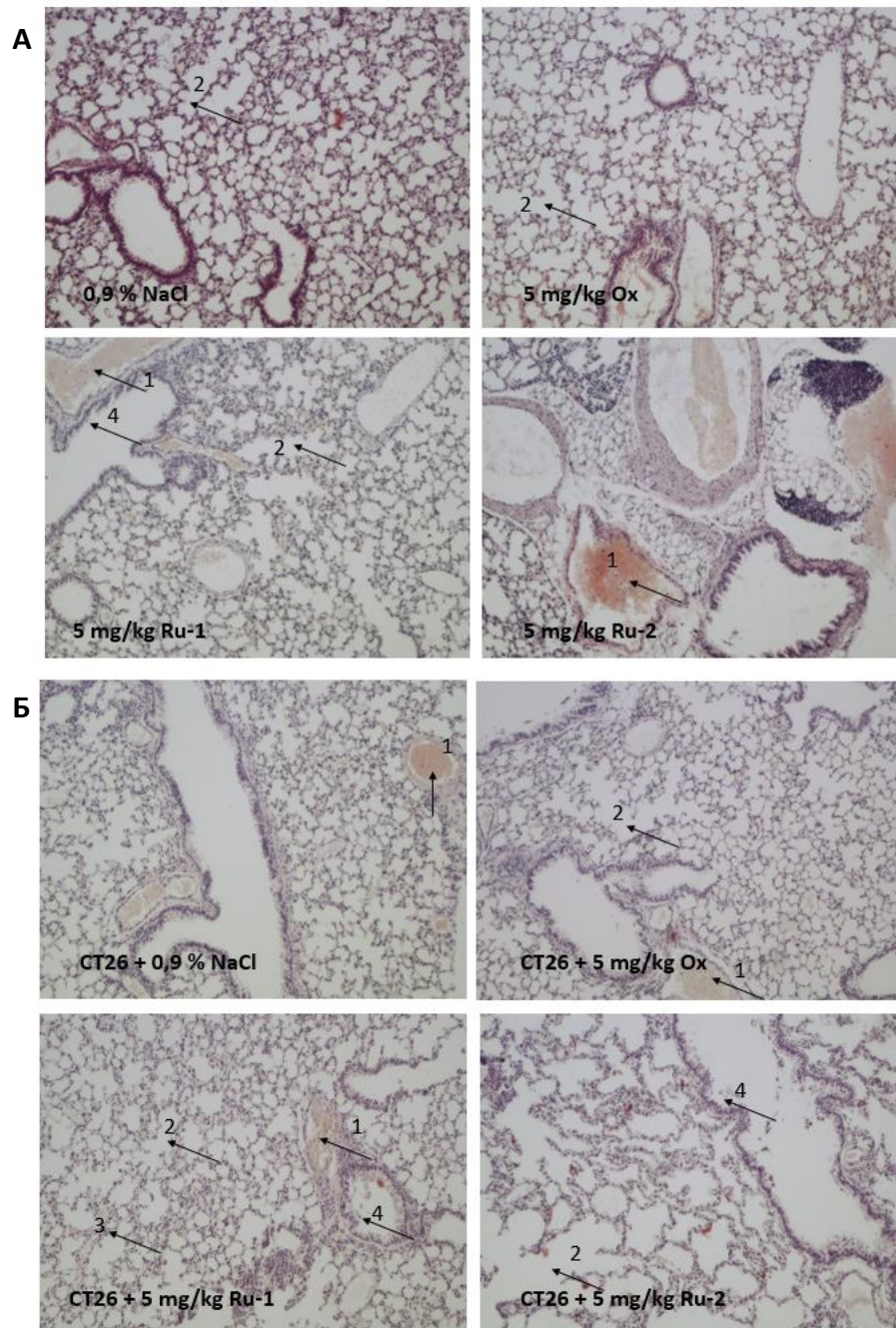
Теста вруће плоче се иначе користи као један од тестова за процену развоја сензорне неуропатије експерименталних животиња, међутим према подацима из литературе, BALB/c мишеви имају повећан праг осетљивости на термални стимулус [168], те с обзиром на ту чињеницу и добијене резултате теста вруће плоче не можемо проценити да ли је дошло до развоја сензорне неуропатије код мишева који су примали комплексе рутенијума(II) или оксалиплатину.

4.6.5. Патохистолошка анализа

У циљу евалуације системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине, који су апликовани здравим мишевима и мишевима са индукованим тумором, интраперитонеално сваки трећи дан у трајању од две недеље и у две дозе - 2 и 5 mg/kg, анализирани су исечци ткива срца, бубрега, плућа и јетре и тумора који су обојени хематоксилином и еозином.

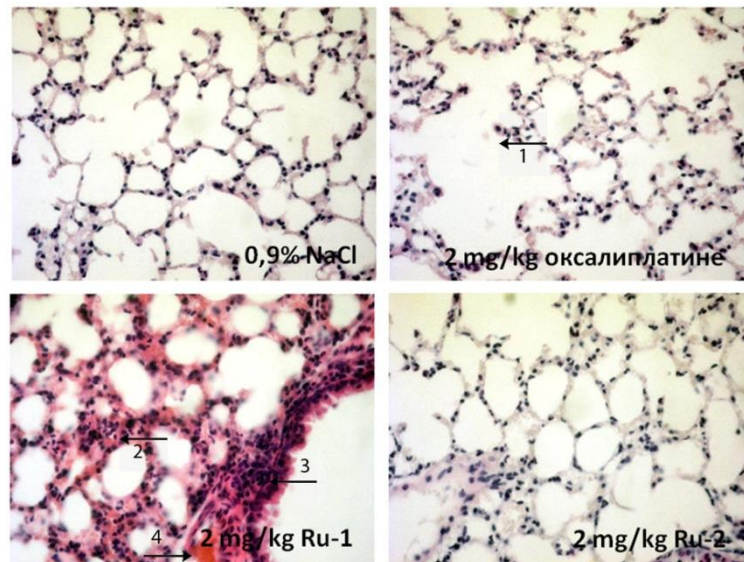
Резултати хистолошке анализе плућа су показали да није дошло до развоја метастаза у плућима, што је и очекивано с обзиром на коришћени хетеротопски модел карцинома колоне.

Микорскопско испитивање хистолошких препарата паренхима плућа здравих мишева и мишева са индукованим тумором који су третирани са 5 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, оксалиплатине или физиолошким раствором, указује на присутну пасивну хиперимију (1) и покидане алвеоларне зидове-емфизем (2) у свим експериментални групама, укључујући и контролну. Док су десквамација алвеоларног епитела (3) и некроза и десквамација респираторног епитела (4) забележене у групама третираним комплексима рутенијум(II), (Слика 6).



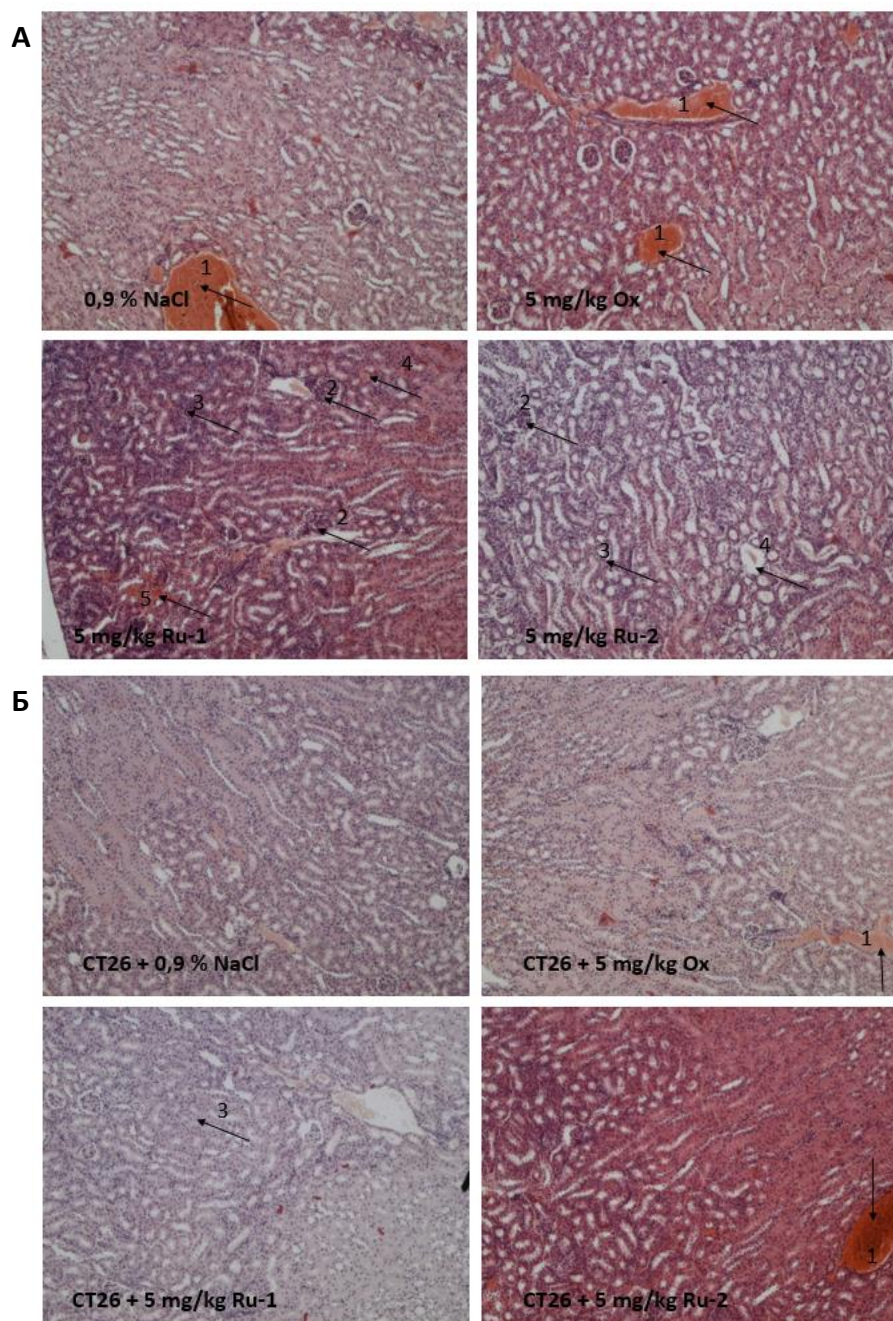
Слика 6. Пресек плућа (100x увећање) (А) здравих и (Б) BALB/c мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - CT26, који су третирани са 5 mg/kg рутенијум(II) терпирин комплексом, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Хистолошка анализа препарата паренхима плућа мишева из свих група третираних са 2 mg/kg испитиваних комплекса, указује на присутност: проширеног ваздушног простора насталог руптуром алеоларних септума (1), интерстицијалне лимфоцитне инфилтрације (2), перибронхијалне лимфоцитне инфилтрација (3) и конгестије (пасивне хиперемije) (4), (Слика 7).



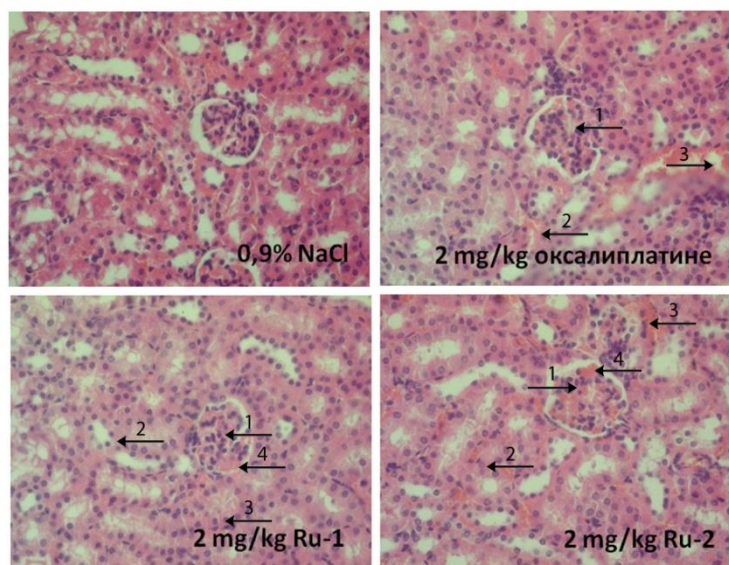
Слика 7. Пресек плућа (100x увећање) BALB/c мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - СТ26, који су третиран са 2 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Хистопатолошка анализа ткивних исечака бубрега указује на присуство пасивне хиперемije (1) у свим експерименталним групама третираним са 5 mg/kg испитиваних комплекса, као и у контролној групи. У групи здравих мишева који су третирани Ru-2 комплексом забележене су промене: хиперцелуларност гломерула (2), паренхиматозна дегенерација епитела каналића (3), интралуминални цилиндри (4), док је у групи мишева третираних Ru-1 комплексом, поред већ наведених промена, забележено и крварење у интерстицијуму (5), (Слика 8).



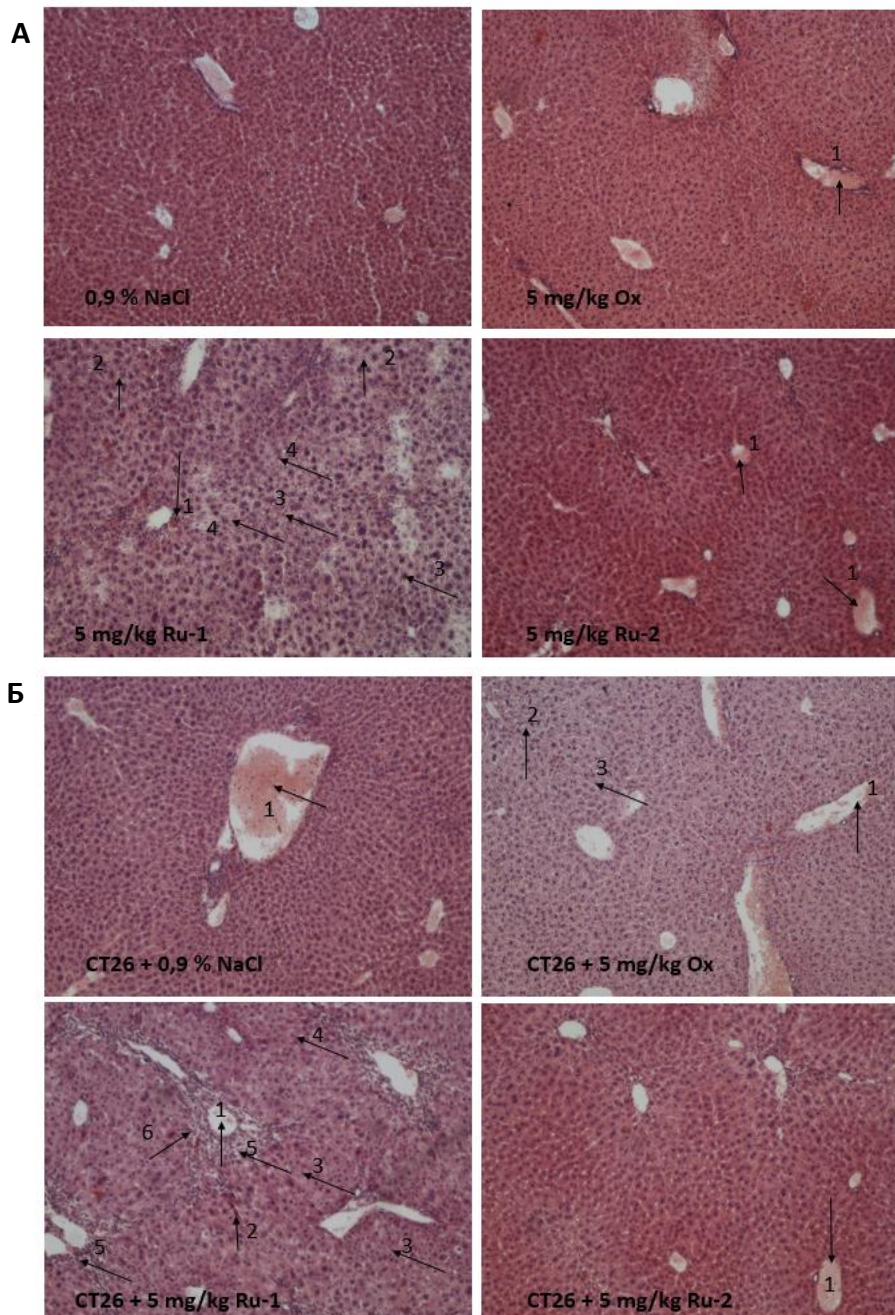
Слика 8. Пресек бубрега (100x увећање) (А) здравих и (Б) BALB/с мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - CT26, који су третирани са 5 mg/kg рутенијум(II) терпирин комплексом, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Промене у ткиву бубрега које су пронађене у свим групама, укључујући контролну и експерименталне групе третиране са 2 mg/kg испитиваних комплекса, су хиперцелуларност гломерула са инфилтрацијом лимфоцита и моноцита (1) и паренхиматозна дегенерација епитела тубула са десквамацијом и некрозом (2). Поред претходно поменутих промена, које су заједничке за све третиране групе, интерстицијално крварење је додатно присутно у групи која је третирана оксалиплатином. Хијалини цилиндри (3) и фокална хијалина промена гломерула (4) су додатно присутни у групи која је третирана Ru-1, а у групи која је третирана Ru-2 су присутни и хијалини цилиндри, глобална хијалина промена и некроза гломерула (4), (Слика 9).



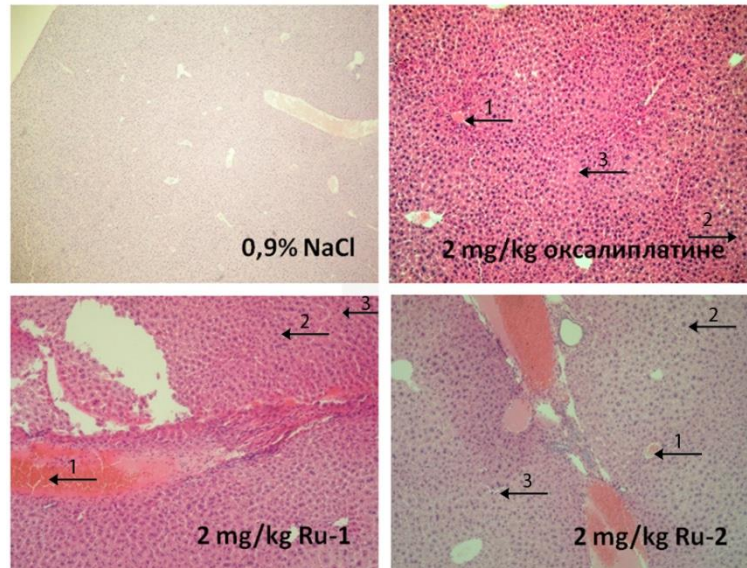
Слика 9. Пресек бубрега (100x увећање) BALB/c мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - СТ26, који су третирани са 2 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Анализа хистопатолошких исечака јетре указује на постојање пасивне хиперемije (1) у свим експерименталним групама третираним са 5 mg/kg испитиваних комплекса. У исечцима јетре из групе мишева са индукованим тумором који су третирани са 5 mg/kg оксалиплатине, додатно су забележене промене типа: анизоцитоза и анизокорија хепатоцита (2) и хидропсна и балонирајућа дегенерација хепатоцита (3). фокална и конфлуентна некроза (4), инфилтрација портних простора (5), портни и перипортни хепатитис (6), (Слика 10).



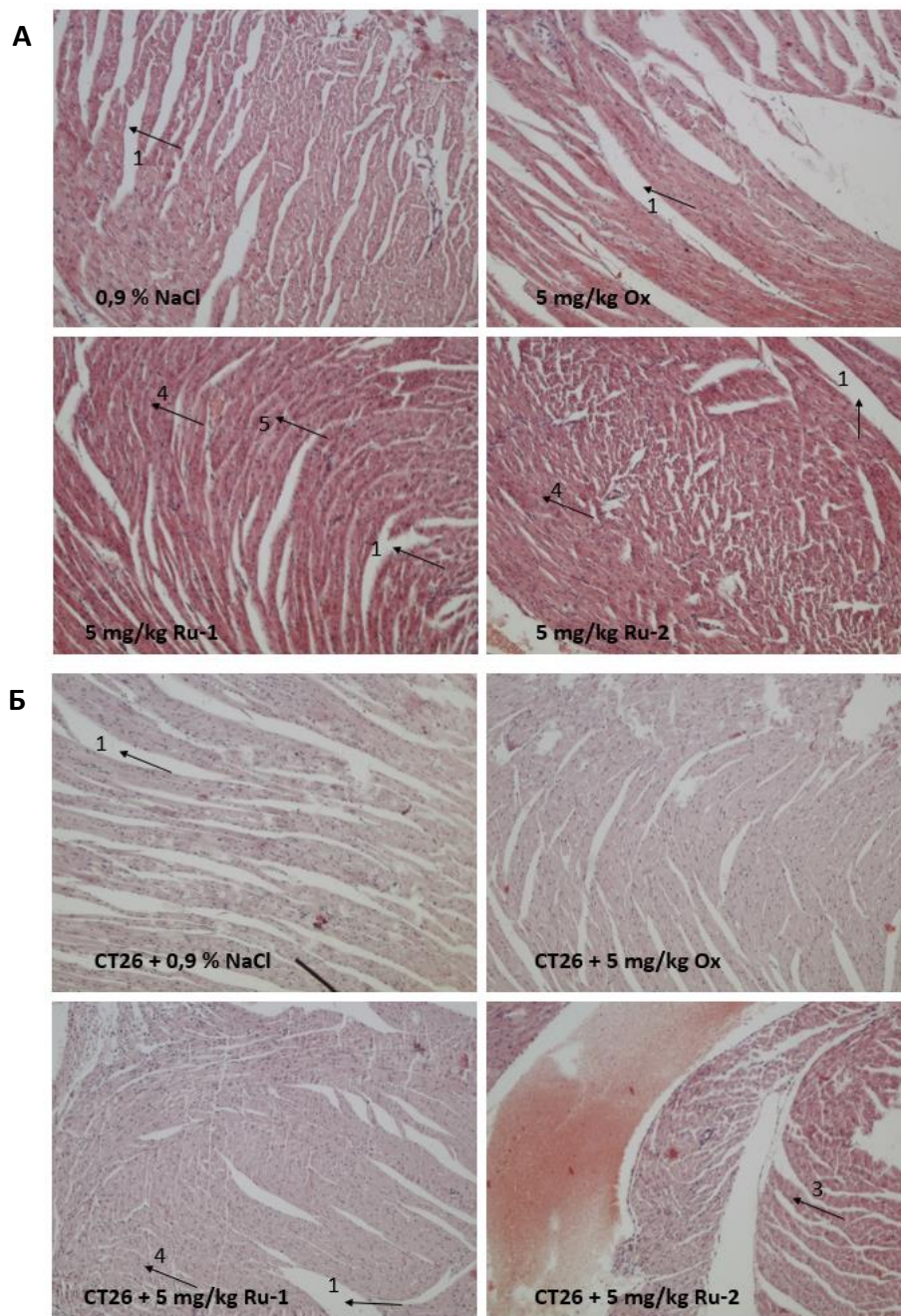
Слика 10. Пресек јетре (100x увећање) (А) здравих и (Б) BALB/с мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - СТ26, који су третирани са 5 mg/kg рутенијум(II) терпирин комплексом, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Промене настале у јетри мишева из све три експерименталне групе, третиране са 2 mg/kg испитиваних комплекса су: пасивна хиперимија – конгестија (1), хидропсна и балон дегенерација хепатоцита (2) и фокална и конфлуентна некроза средње и периферне - портне зоне лобулуса, су заједничке за све третиране групе 2 mg/kg (3), (Слика 11).



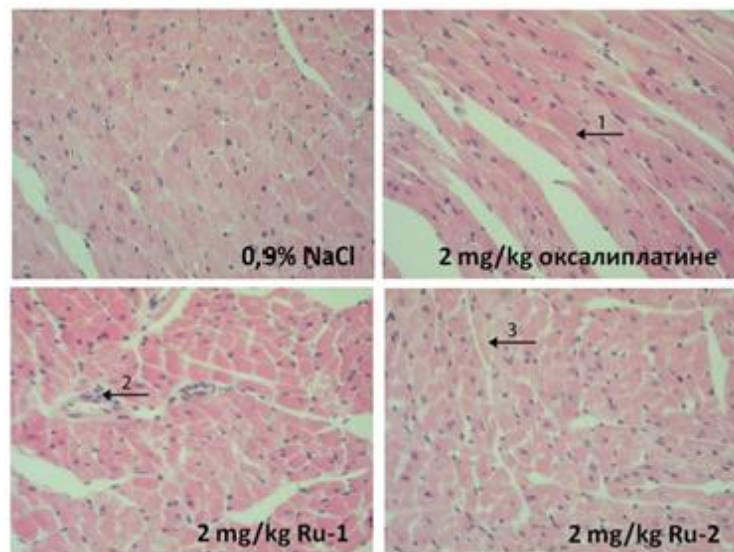
Слика 11. Пресек јетре (40x увећање) VALB/c мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - СТ26, који су третирани са 2 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Хистолошки пресек препарата срца мишева третираних са 5 mg/kg испитиваних комплекса, како здравих тако и са индукованим тумором, указују на присуство проширеног интерстицијума (1) у готово свим третираним групама, укључујући контролну групу мишева који су примали само физиолошки раствор. Пасивна хиперимија (2), хипертрофија (3) и дегенеративне промене кардиомиоцита (4) су забележене у групи мишева који су третирани комплексом Ru-2, док је код здравих мишева третираних комплексом Ru-1 додатно развијена и фокална коагулациона некроза миокарда (5), (Слика 12).



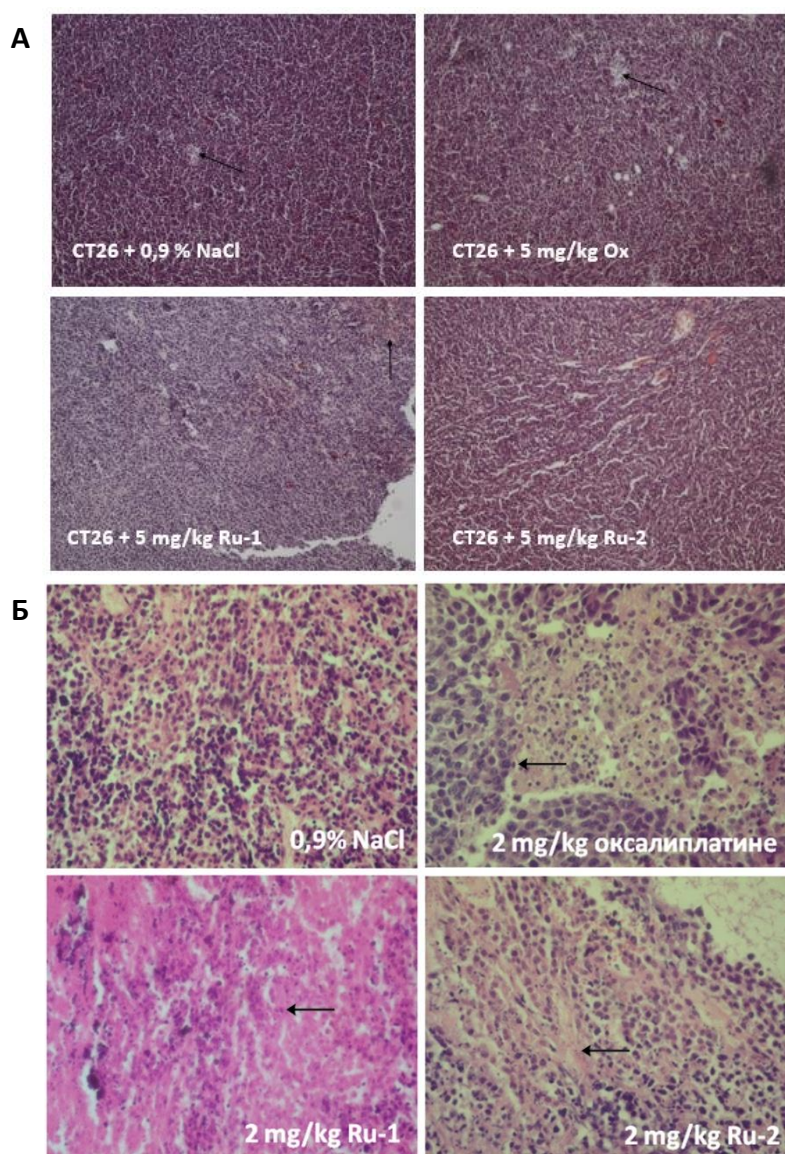
Слика 12. Пресек срца (100x увећање) (А) здравих и (Б) BALB/с мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - СТ26, који су третирани са 5 mg/kg рутенијум(II) терпирин комплексом, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Хистолошка анализа срца открила је хипертрофија мишићних влакана (1) са хомогенизацијом саркоплазме (3) и проширењем интерстицијума уз лимфоцитни запаљенски инфилтрат периваскуларно (2) у свим групама третираним са 2 mg/kg испитиваних комплекса рутенијума(II) и оксалиплатине (**Слика 13**).



Слика 13. Пресек срца (100x увећање) BALB/c мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - СТ26, који су третирани са 2 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, оксалиплатине или физиолошким раствором.

Хистолошки пресек препарата примарног тумора мишева третираних са 2 mg/kg оксалиплатине показује наглашена поља некрозе географског типа која нису већа од поља некроза у туморима нетретираних мишева. Највећи део примарног тумора мишева третираних са 2 mg/kg Ru-1 је некротичан. Поља некроза у туморима мишева третираних са 2 mg/kg Ru-2 су већа у поређењу са пољима некрозе у туморима нетретираних мишева и мишева третираних оксалиплатином, али су мања у поређењу са пољима некрозе у туморима мишева третираних Ru-1 (Слика 14).



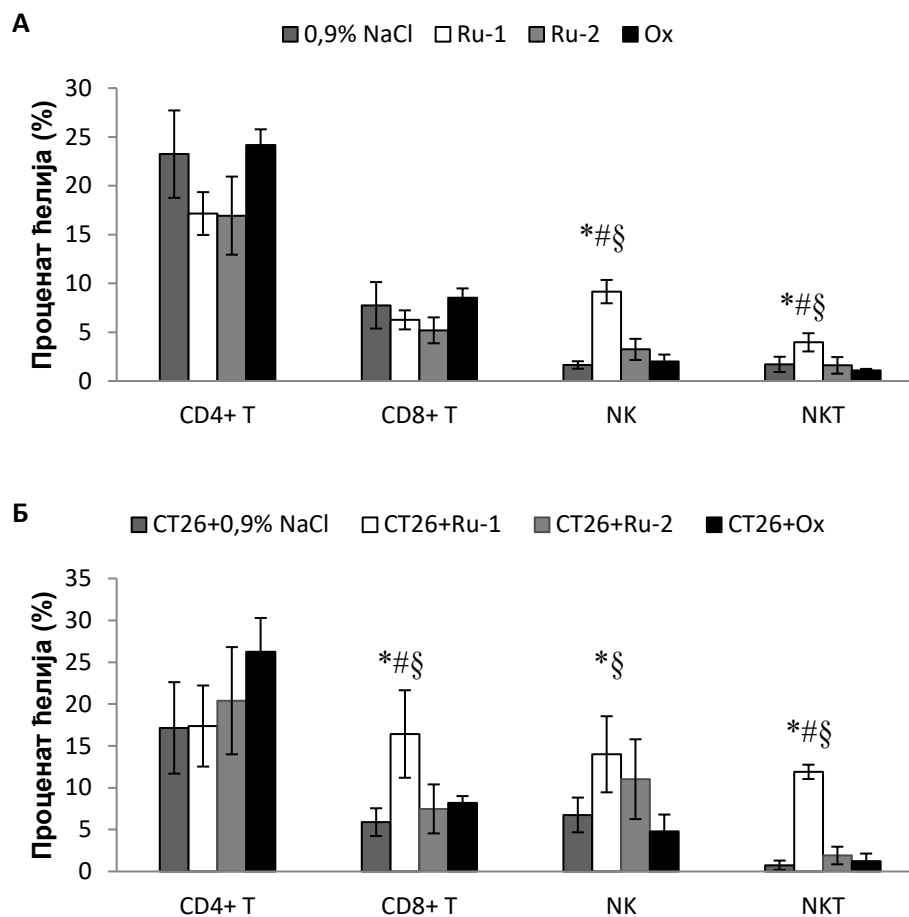
Слика 14. Пресек примарног тумора CT26 (100x увећање) BALB/c мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона - CT26, који су третирани са (А) 5 mg/kg и (Б) 2 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, оксалиплатине или физиолошким раствором.

4.6.6. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на заступљеност ћелија имуног система у периферној крви

Применом проточне цитометрије одређен је проценат појединих ћелија имуног система у периферној крви здравих мишева и мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона, који су третирани са 5 mg/kg рутенијум(II) терпиридин комплекса, 5 mg/kg оксалиплатине или физиолошким раствором.

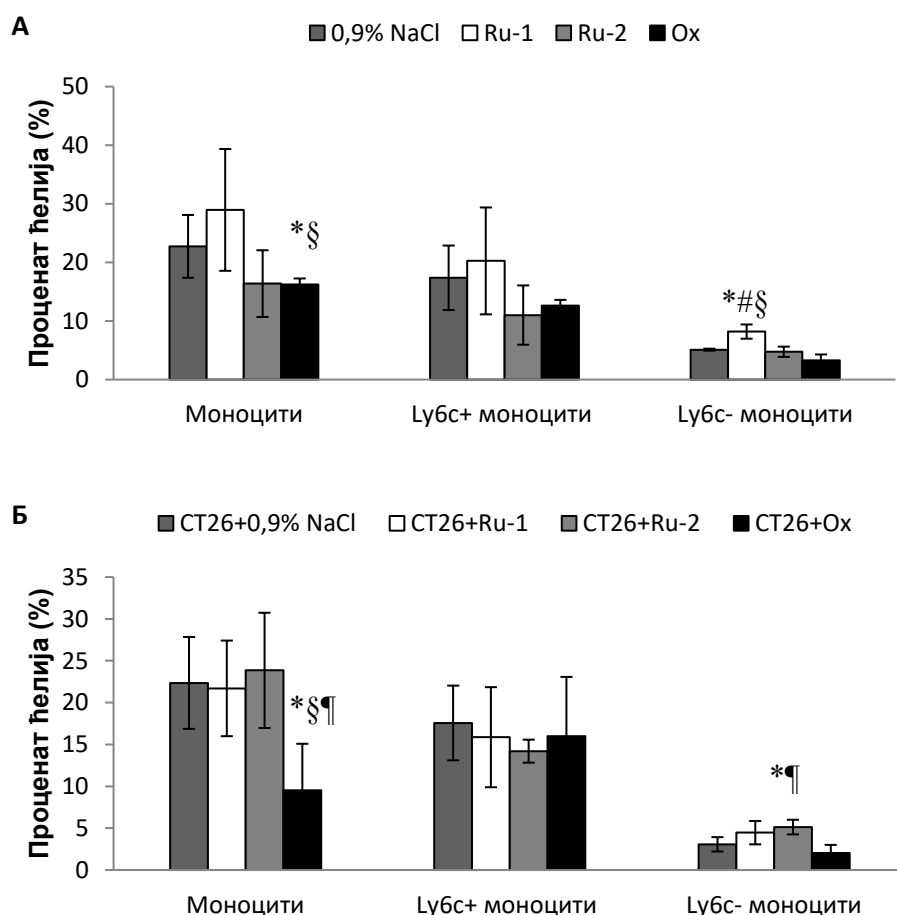
Процент $CD4^+$ Т лимфоцита и $CD8^+$ Т лимфоцита, је био мањи у групи здравих мишева који су интраперитонеално примали оба рутенијум(II) терпиридин комплекса у односу на мишеве који су третирани оксалиплатином или само физиолошким раствором, али без статистичке значајности. Док је проценат НК ћелија и NKT ћелија био статистички значајно већи у групи здравих мишева који су примали интраперитонеално Ru-1 комплекс у односу на мишеве који су интраперитонеално примали Ru-2 комплекс, оксалиплатину или физиолошки раствор (**Графикон 33А**).

Примена Ru-1 комплекса код мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона је довела до статистички значајног повећања процентуалне заступљености $CD8^+$ Т лимфоцита и NKT ћелија у односу на све остале групе и статистички значајно виши процентуални удео НК ћелија у односу на контролну групу и групу која је третирана оксалиплатином. Примена оксалиплатине код мишева са индукованим СТ26 тумором, је утицала да проценат $CD4^+$ Т лимфоцита буде већи у односу на обе групе третиране рутенијум(II) терпиридин комплексима и у односу на контролну групу, али без статистичке значајности (**Графикон 33Б**).



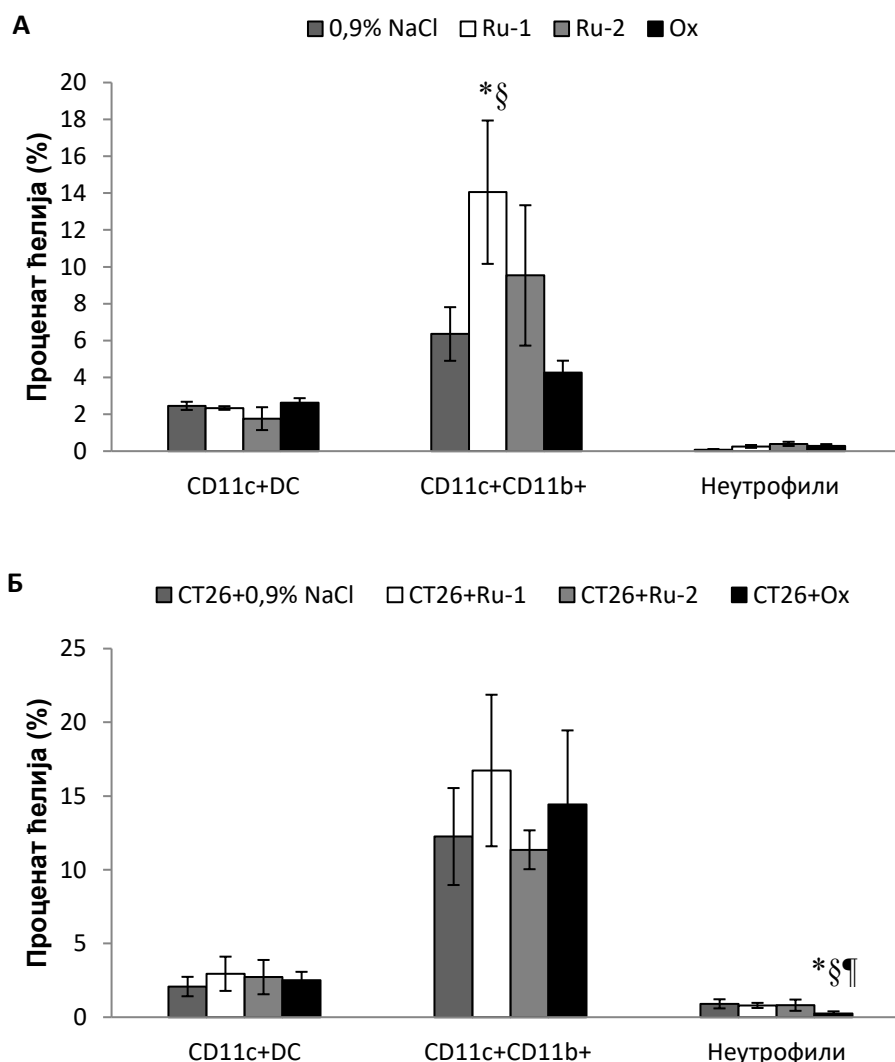
Графикон 33. Процентуална заступљеност CD4⁺ Т лимфоцита, CD8⁺ Т лимфоцита, NK и NKT ћелија у периферној крви код (А) здравих мишева и (Б) мишева са индукованим СТ26 тумором, након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

Процентуални удео моноцита је био статистички значајно мањи у групи здравих мишева који су интраперитонеално примали оксалиплатину у односу на мишеве који су интраперитонеално примали Ru-1 комплекс или физиолошки раствор. Процент популације Lybс⁻ моноцита је био статистички значајно виши у групи здравих који су интраперитонеално примали Ru-1 комплекс у односу на мишеве који су интраперитонеално примали оксалиплатину, Ru-2 комплекс или физиолошки раствор. Док је примена оксалиплатине и Ru-2 комплекса код здравих мишева довела до смањења процентуалног удела популације Lybс⁺ моноцита у односу на групу третирану комплексом Ru-1 и контролну групу, али без постизања статистичке значајности (Графикон 34А). Примена оксалиплатне је довела до статистички значајног пада процентуалног удела моноцита код мишева са индукованим СТ26 тумором у односу на контролну групу и у односу на мишеве који су интраперитонеално примали оба рутенијум(II) терпиридинска комплекса. Мишеви са СТ26 тумором који су третирани Ru-2 комплексом су имали статистички значајно већи проценат популације Lybс⁻ моноцита у односу на контролну групу и групу која је примала оксалиплатину, док није било значајне разлике између група у процентуалној заступљености популације Lybс⁺ моноцита (Графикон 34Б).



Графикон 34. Процентуална заступљеност моноцита, Lybс⁺ и Lybс⁻ популације моноцита у периферној крви код (А) здравих мишева и (Б) мишева са индукованим СТ26 тумором, након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

Процент популације $CD11c^+ + CD11b^+$ је био статистички значајно виши у групи здравих мишева који су примали интраперитонеално Ru-1 комплекс у односу на мишеве који су интраперитонеално примали оксалиплатину или физиолошки раствор. Док се процент популације $CD11c^+ + DC$ и неутрофила није статистички значајно разликовао између група здравих мишева који су примали рутенијум(II) терпиридин комплексе, оксалиплатину или физиолошки раствор (**Графикон 35А**). Процентуална заступљеност неутрофила је била статистички значајно нижа у групи мишева са тумором који су интраперитонеално примали оксалиплатину у односу на мишеве који су интраперитонеално примали рутенијум(II) терпиридин комплексе или физиолошки раствор. Док се процент популације $CD11c^+ + DC$ и $CD11c^+ + CD11b^+$ ћелија нису статистички значајно разликовао између група мишева са тумором који су примали комплексе рутенијума(II), оксалиплатину или физиолошки раствор (**Графикон 35Б**).

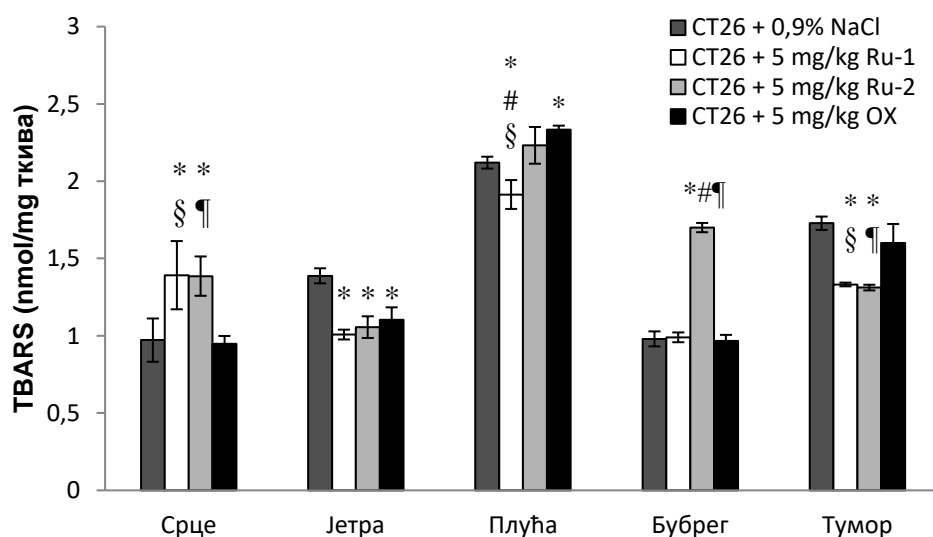


Графикон 35. Процентуална заступљеност неутрофила и популације $CD11c^+ + DC$, $CD11c^+ + CD11b^+$ ћелија у периферној крви код (**А**) здравих мишева и (**Б**) мишева са индукованим CT26 тумором, након примене испитиваних рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

4.6.7. Оксидациони статус здравог и туморског ткива мишева

4.6.7.1. Ниво TBARS у хомогенату здравог и туморског ткива мишева

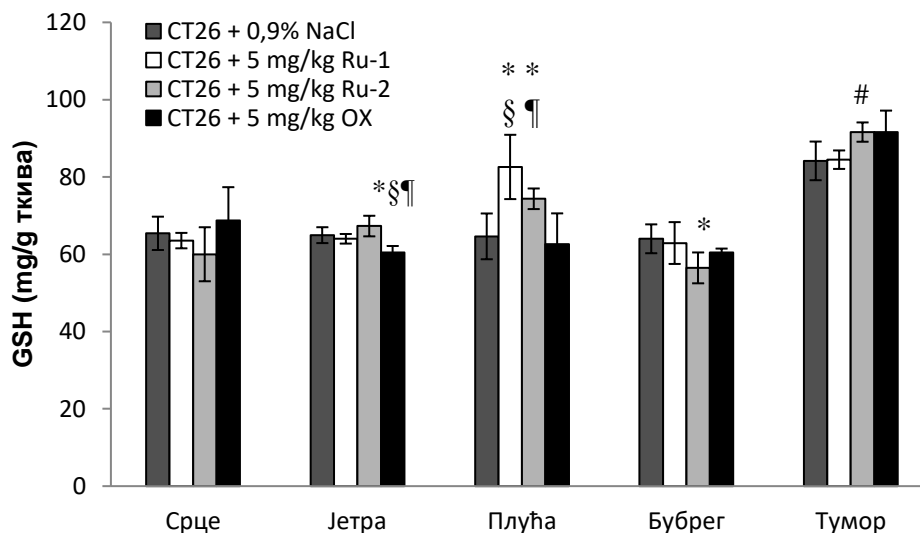
Ефекти примене рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на вредности индекса липидне пероксидације (изражен као TBARS) у хомогенату здравог и туморског ткива су представљени на **Графикону 36**. Вредности TBARS су статистички значајно повећане у срцу мишева који су третирани комплексима рутенијума(II), у поређењу са групом која је примала оксалиплатину или физиолошки раствор. Забележено је значајно снижење вредности TBARS у јетри мишева из свих експерименталних група у односу на контролу. Примена оксалиплатине је довела до статистички значајног повећања вредности TBARS у плућима у односу на контролу и у односу на групу мишева третираних са Ru-1. Док је у ткиву бубрега забележен значајан скок TBARS у групи мишева који су били третирани са Ru-2, у поређењу са свим осталим групама. Примена комплекса рутенијума(II) је довела до значајног снижења вредности TBARS у туморском ткиву у односу на групу која је примала оксалиплатину или физиолошки раствор.



Графикон 36. Вредности TBARS у хомогенату здравог и туморског ткива након примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

4.6.7.2. Ниво редукованог глутатиона (GSH) у хомогенату здравог и туморског ткива мишева

Ефекти примене рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на вредности редукованог глутатиона (GSH) у хомогенату здравог и туморског ткива су представљени на **Графикону 37**. Примена оксалиплатине довела до значајног снижења вредности GSH у јетри у односу на све остале групе. Док је количина GSH значајно повећан у плућима мишева који су примали рутенијум(II) терпиридин комплексе у поређењу са групом која је примила оксалиплатину и контролном групом, али са друге стране примена Ru-2 значајно је снизила вредност GSH у бубрезима у поређењу са контролном групом и повисила вредности GSH у ткиву тумора у односу на групу третирану са Ru-1 комплексом. Није постојала статистички значајна разлика у вредностима GSH између група у срцу.

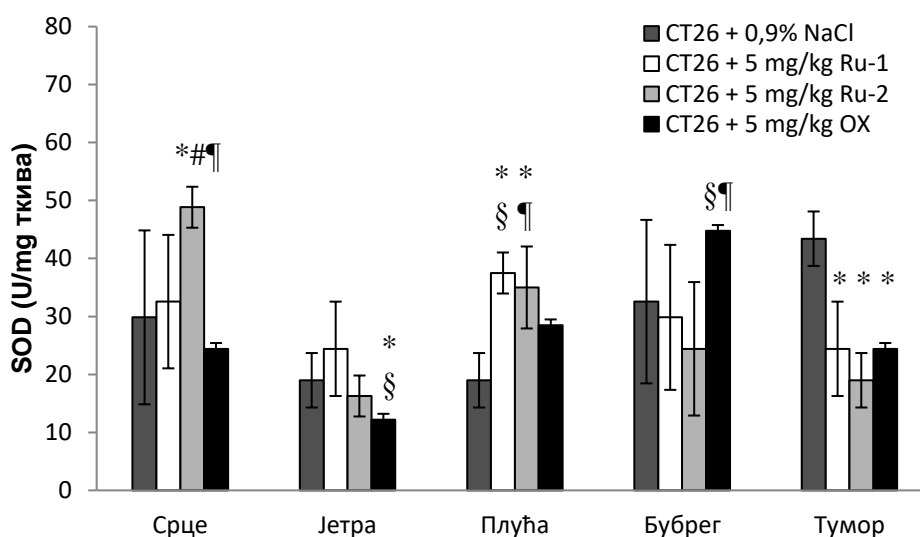


Графикон 37. Вредности GSH у хомогенату здравог и туморског ткива након примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

4.6.7.3. Активност супероксид-дисмутазе (SOD) у хомогенату здравог и туморског ткива мишева

Ефекти примене рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на активност антиоксидантног ензима - супероксид-дисмутазе (SOD) у хомогенату здравог и туморског ткива су представљени на **Графикону 38**.

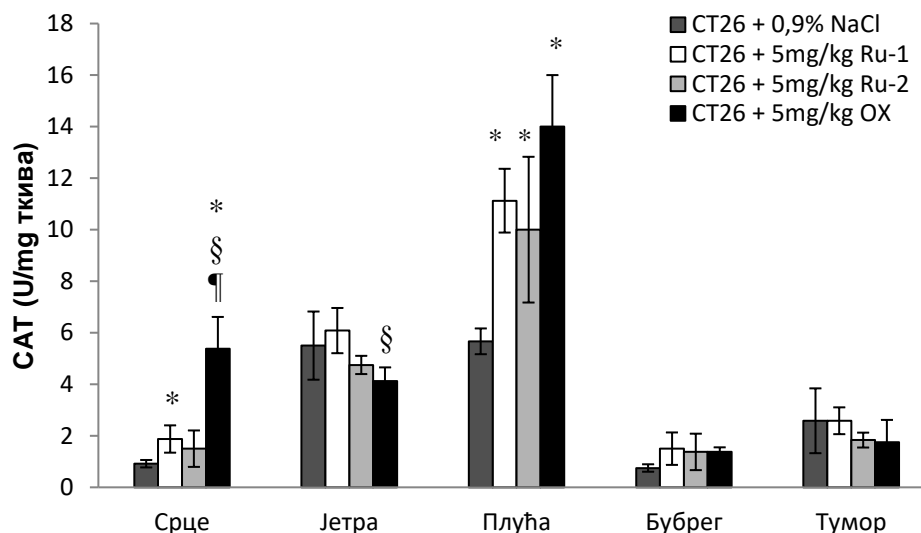
У срцу мишева који су примали Ru-2, измерено је значајно повећање активности SOD у односу на све остале групе. Активност SOD у ткиву јетре мишева који су третирани оксалиплатином је била значајно смањена у поређењу контролном групом и са групом мишева који су примали Ru-1 комплекс. Активност SOD је била значајно повећана у плућима мишева који су примали Ru-1 комплекс у поређењу са контролном групом и групом мишева који су третирани оксалиплатином, активност SOD је такође била повећана и у групи третираној Ru-2 комплексом у поређењу са контролом. Док је у ткиву бубрега мишева третираних оксалиплатином забележена повећана активност SOD у односу на групе третиране рутенијум(II) терпиридинским комплексима. У туморском ткиву мишева који су третирани испитиваним рутенијум(II) терпиридинским комплексима и оксалиплатином је забележено статистички значајно смањење активности SOD у поређењу са контролном групом.



Графикон 38. Активност SOD у хомогенату здравог и туморског ткива након примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; ¶ Ru-2 vs. OX).

4.6.7.4. Активност каталазе (САТ) у хомогенату здравог и туморског ткива мишева

Ефекти примене рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине на активност каталазе (САТ) у хомогенату здравог и туморског ткива су представљени на **Графикону 39**. Активност ензимског антиоксиданса - САТ је значајно повећана у срцу мишева који су примали оксалиплатину у поређењу са свим осталим групама и у срцу мишева који су примили Ru-1 у поређењу са контролном групом. Такође, активност САТ је значајно повећана у плућима у све три експерименталне групе у поређењу са контролном групом, али је значајно смањена у јетри мишева који су примали оксалиплатину у поређењу са мишевима који су примали Ru-1. Није било статистички значајних разлика у активности САТ у ткиву бубрега и тумора између група.



Графикон 39. Активност САТ у хомогенату здравог и туморског ткива након примене рутенијум(II) терпиридин комплекса или оксалиплатине у дози од 5 mg/kg. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација, (12 мишева по групи, *Student's t* тест, $p < 0,05$, *мишеви третирани физиолошким раствором vs. мишеви третирани са Ru-1, Ru-2 или оксалиплатином, # Ru-1 vs. Ru-2; § Ru-1 vs. OX; † Ru-2 vs. OX).

5. ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Основа за дизајн, синтезу и испитивања комплексних једињења рутенијума у погледу њихове потенцијалне примене за лечење карцинома била је потреба да се изведе агенс (металофармацеутик) јачег и ширег спектра активности са профилем смањене токсичности у односу на дисплатину и њене аналоге. Већина испитиваних комплексних једињења рутенијума су показала висок антитуморски потенцијал што је био услов да се даља истраживања спроведу у различитим фазама клиничких испитивања [85, 72, 83].

У овој докторској дисертацији испитивани су потенцијално цитотоксични рутенијум(II) терпиридин комплекси према туморским ћелијским линијама карцинома колона (мишија - CT26, хумане - SW480 и HCT116) и мезенхималним матичним ћелијама миша (mMSCs). Одређиван је тип ћелијске смрти коју индукују и њихов утицај на дистрибуцију ћелијског циклуса. На сингеном хетеротопском моделу мишијег карцинома колона *in vivo*, одређивани су антитуморски потенцијали и процене системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса.

5.1. Цитотоксично дејство рутенијум(II) терпиридин комплекса на ћелијске линије карцинома колона и мезенхималне матичне ћелије миша

Испитивања цитотоксичних потенцијала рутенијум(II) терпиридин комплекса спроведена су *in vitro* на моделу хумане и мишије туморске ћелијске линије и на mMSCs (поседују протуморски ефекат). Помоћу туморских ћелијских линија могуће је утврдити ћелијске механизме, покретање сигналних путева и осетљивост или резистенцију према испитиваном агенсу [169]. За испитивања различитих начина администрације потенцијалног лека и одређивање фармакокинетичких параметара неопходно је спровести додатне експерименте на анималним моделима болести *in vivo* [170].

Резултати МТТ теста су јасно показали да рутенијум(II) терпиридин комплекси поседују значајну дозно-зависну цитотоксичну активност према ћелијама карцинома колона миша (CT26), као и хуманим ћелијама карцинома колона (SW480 и HCT116) али и мезенхималним матичним ћелијама миша (mMSCs) (**Графикони 1-8**). Након 24-часовног третмана туморских CT26 ћелија, забележено је да при вишим концентрацијама Ru-1 има израженији цитотоксични ефекат од оксалиплатине (референтна супстанца), који се продужавањем времена третмана на 72 часова, изједначава са оксалиплатином (**Графикони 1, 2**). Цитотоксични ефекти рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине након 24-часовне инкубације са HCT116 ћелијама је сличан, међутим, продужењем времена инкубације повећава се осетљивост HCT116 ћелија на примену оксалиплатине у вишим концентрацијама (**Графикони 3, 4**). Осетљивост SW480 ћелија на примену рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине у трајању од 24 сата је готово идентична при већини концентрација, изузев при највишој примењеној концентрацији, при којој су SW480 ћелије осетљивије на примену комплекса рутенијума(II). Међутим, када је време третмана продужено на 72 сата, повећана је осетљивост SW480 ћелија на примену оксалиплатине (**Графикони 5, 6**). Након 24-часовне инкубације mMSCs уочава се подједнако цитотоксично дејство оксалиплатине и комплекса Ru-2, док Ru-1 има нешто израженије цитотоксично дејство. Када је време инкубације продужено на 72 сата, повећана је осетљивост ћелија на примену оксалиплатине при свим концентрацијама и на примену рутенијум(II) терпиридин комплекса при највишим концентрацијама (**Графикони 7, 8**). С обзиром на

то да су MSCs саставни део микроокружења тумора и да имају улогу у прогресији тумора и резистенцији на лекове, потврђено цитотоксично дејство испитиваних комплекса према њима је од изузетне важности. До сада је доказано да поједини органометални комплекси рутенијума испољавају цитотоксично дејство према хуманим MSCs [171].

IC₅₀ вредности добијене након излагања ћелија испитиваним комплексима у трајању од 24 и 72 сата, указују на то да је цитотоксични ефекат Ru-1 на мишје и хумане ћелије карцинома колона приближан ефекту оксалиплатине и да су оба комплекса рутенијума(II) значано мање цитотоксична по mMSCs у односу на оксалиплатину (Табела 2). Такође, на основу добијених IC₅₀ вредности за комплексе рутенијума(II) може се закључити да је њихов цитотоксични потенцијал најјачи према хуманим ћелијама карцинома колона (HCT116) и mMSCs затим нешто слабији према хуманим ћелијама карцинома колона (SW480) и најслабији према ћелијама карцинома колона миша (CT26). Док, оксалиплатина има подједнако изражену цитотоксичност према обе хумане ћелијске линије карцинома колона (HCT116 и SW480) и mMSCs, а исто као и комплекси рутенијума(II) најслабију према ћелијама карцинома колона миша (CT26) (Табела 2).

Добијени резултати су у складу са резултатима сличних истраживања у којима су оба рутенијум(II) терпиридинска комплекса - [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl (Ru-1) и [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl (Ru-2) показала умерену до високу *in vitro* цитотоксичну активност према хуманој ћелијској линији карцинома грлића материце (HeLa) и хуманим ћелијама карцинома плућа (A549) и умерену цитотоксичност према здравим ћелијама, односно, хуманим фибропластима плућа (MRC-5), са IC₅₀ за Ru-1 (32,80 - 66,30 μM) и IC₅₀ за Ru-2 (72,80 - 110,80 μM) [146, 147].

Цитотоксични потенцијал рутенијум(II) терпиридин комплекса на туморске ћелије (CT26, HCT116, SW480) и mMSCs, поред МТТ тестом, потврђен је и LDH тестом. МТТ тест прати активност ензима у митохондријама вијабилних ћелија и осликава стање живих ћелија. За разлику од МТТ теста, LDH тест осликава заступљеност некротичних ћелија, јер се заснива на мерењу активности ензима лактат дехидрогеназе, који се након дезинтеграције ћелијске мембране ослобађа у медијум у коме се ћелије култивишу и из кога се и одређује [172, 173]. Анализа резултата LDH теста, након култивације у трајању од 24 часа указује на то да рутенијум(II) терпиридин комплекси за разлику од оксалиплатине утичу на интегритет ћелијске мембране испитиваних ћелијских линија, као алтернативни начин индукције ћелијске смрти, што је у складу са до сада постојећим резултатима [174, 175]. Примена комплекса Ru-1 доводи до дозно зависне појаве некрозе ћелија, са најнижим процентом забележеним код HCT116 ћелија (8,37%), нешто вишим код CT26 ћелија (36,43%) и највишим код mMSCs (60,73%). Примена комплекса Ru-2 је у мањем степену индуковала некрозу код свих испитиваних ћелија осим код SW480 ћелија (33,07%). Оксалиплатина није довела до некрозе CT26, HCT116, SW480 и mMSCs, ни при највишој примењеној концентрацији (300 μM). Ови резултати, добијени у нашој студији, су слични резултатима добијеним на основу испитивања рутенијум(II) полипиридил комплекса, који када се примене у нижим концентрацијама не утичу на ослобађање ензима LDH из различитих туморских ћелија (HeLa, PC3, LanCap, MCF-7 и MD-MBA 231), међутим, када се примене више концентрације, активност LDH се значајно повећава у култивационом ћелијском медијуму [176]. Резултати добијени на основу испитивања утицаја комплексних једињења рутенијума(II) са ароматичним лигандима на ћелијама карцинома колона, такође, указују на низак процентат индукције некрозе ћелија [177, 178, 179] (Графикони 9-12).

5.2. Тип ћелијске смрти индукован рутенијум(II) терпиридин комплексима

У циљу испитивања механизма којим рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују цитотоксично дејство, ћелије су након инкубације са испитиваним комплексима бојене одговарајућим флуорохромима и анализирани на проточном цитофлуориметру.

Комплекси рутенијума(II) могу изазвати апоптозу различитим антипролиферативним механизмима или индуковањем заустављања ћелијског циклуса у *G0/G1*, *S* или *G2/M* фази [180]. Испитивани комплекси рутенијума(II) доводе до повећања процента CT26 ћелија у раној и касној фази апоптозе, мада у нижем проценту у односу на оксалиплатину (**Графикон 13**). Ефекат примене комплекса Ru-1 огледао се у благом порасту процента HCT116 ћелија у касној фази апоптозе, идентично примени оксалиплатине. Сви испитивани комплекси нису значајније утицали на проценат HCT116 ћелија у раној апоптози (**Графикон 14**). Највећи проценат SW480 ћелија у раној фази апоптозе али и касној апоптози, детектован је након третирања оксалиплатином. Третман комплексом Ru-2 је довео до повећања процента ћелија у раној апоптози, док комплекс Ru-1 није довео до значајнијег повећања процента апоптотских SW480 ћелија у односу на нетретиране ћелије (**Графикон 15**).

Досадашња истраживања која су се бавила испитивањем различитих протокола примене рутенијум(II) комплекса и оксалиплатине и њиховог утицаја на апоптозу CT26 и HCT116 ћелија, показала су да комплекси рутенијума(II) индукују рану и касну апоптозу на дозно- и временски зависан начин, али у мањем обиму у поређењу са оксалиплатином, што корелира са нашим резултатима. Иако оксалиплатина ефикасније индукује апоптозу код CT26 и HCT116 ћелија у поређењу са комплексима рутенијума(II), ти ефекти се сматрају умереним, што је доказано и у истраживањима сличног дизајна [177, 181, 182]. Комплекси рутенијума(II) у зависности од координованог лиганда могу да испоље различит утицај на индукцију апоптозе у SW480 ћелијама, од врло јаког, са чак 72% ћелија у апоптози, до умереног утицаја, са 31% апоптотских ћелија [178]. У нашем истраживању дошли смо до сличних запажања, с обзиром да је комплекс рутенијума(II) који у својој структури садржи *dach* лиганд (Ru-2 комплекс) увео у апоптозу 6,14% SW480 ћелија, што је скоро дупло више у поређењу са рутенијум(II) комплексом који садржи *en* лиганд (Ru-1 комплекс) 3,24% SW480 ћелија. Познато је да клинички испитивани рутенијум(III) комплекс - KP1339, кроз индукцију оксидационог стреса и стреса ендоплазматског ретикулума изазивају апоптозу SW480 и HCT116 ћелијских линија хуманог карцинома колона. Комплекси рутенијума интерагују са молекулом ДНК и индукују оксидациони стрес у ћелијама, свој цитотоксични ефекат на ћелије доминантно остварују услед акумулације у митохондријама, у којима изазивају дисфункцију, која за последицу има активацију митохондријалног пута апоптозе [107, 183, 184, 185, 186].

Хемиотерапеутски агенси, поред антипролиферативног ефекта на ћелије карцинома, утичу и на здрава пролиферативна ткива, стога токсични ефекти испољени на овим ткивима дефинишу ограничења њихове употребе. С обзиром на то да се регенерација ткива након терапије карцинома ослања на опстанак и функцију матичних ћелија специфичних за орган, неопходно је боље разумевање утицаја хемотерапијских агенаса на ове ћелије [187]. Улога MSCs у развоју тумора још увек није сасвим јасна и може подразумевати чак и сасвим супротне ефекте [17, 188, 189].

Иако постоје истраживања која говоре о томе да MSCs супримирају раст тумора, много је више оних која подржавају теорију да MSCs делују про-туморски, односно потпомажу прогресију тумора и развој метастаза. MSCs испољавају тропизам према скоро свим типовима тумора, јер тумори луче цитокине који их привлаче. Протуморске

карактеристике MSCs су доказане на више анималних модела тумора, између осталих и на анималном моделу карцинома колона [11, 190]. Овакви контрадикторни подаци о утицају MSCs на развој тумора могу бити последица различитих експерименталних услова, као што су разлике у експерименталним протоколима, пореклу ћелија (масно ткиво, костна срж или периферна крв) и путу администрације ћелија (интрамукуларно, интравенско или субкутано). Јер, док поједина истраживања указују на то MSCs које потичу из различитих ткива имају сличне карактеристике, које се односе на експресију површинских ћелијских антигена, имуномодулаторну способност и тропизам према тумору [191, 192], друга истраживања указују на то да MSCs изоловане из два различита ткива експримирају различит сет гена, који рефлектује различито порекло и потенцијал за диференцијацију у одређене ћелијске типове [193, 194, 195].

Због свега наведеног, веома је важно проценити ефекат антитуморских лекова на MSCs. Наши резултати показују да су испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси цитотоксични за ћелијске линије карцинома колона и подједнако цитотоксични за mMSCs. Овакав резултат представља допринос њиховој укупној ефикасности у борби против карцинома. У спроведеном истраживању, оксалиплатина је показала изразиту цитотоксичност према mMSCs мерено МТТ тестом, док мерено LDH тестом, оксалиплатина готово да не индукује некрозу mMSCs. Одређивањем типа смрти коју изазивају, утврђено је да испитивани комплекси рутенијума(II) доводе до знатног повећања процента mMSCs у касној фази апоптозе (**Графикон 16**). За разлику од оксалиплатине и испитиваних комплекса рутенијума(II), цисплатина не доводи до апоптозе MSCs *in vitro* и *in vivo*, нити утиче на ћелијску морфологију, адхезију и потенцијал за диференцијацију MSCs [196, 197]. С обзиром на појаву бројних доказа који указују на улогу MSCs у развоју тумора, све се више спроводе истраживања у којима су управо ове ћелије циљна мета антитуморских лекова [18, 198, 199].

5.3. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на дистрибуцију ћелијског циклуса

Процентуална заступљеност ћелија у одређеним фазама ћелијског циклуса након њиховог 24-часовног излагања рутенијум(II) терпиридин комплексима и оксалиплатини у одговарајућим IC₅₀ концентрацијама за сваку ћелијску линију детерминисана је проточном цитометријом.

Апоптоза и заустављање ћелијског циклуса су два процеса која су повезана на различите начине. Једна од најважнијих мета антитуморских лекова је управо регулација ћелијског циклуса, посебно заустављање ћелијског циклуса у G1 и G2 фази има пресудну улогу у развоју ћелијског циклуса. Познато је да је заустављање у G2/M фази ћелијског циклуса један од могућих механизма индукције апоптозе. С друге стране, заустављање у G0/G1 фази обично спречава пролиферацију ћелија, али нуди ћелијама могућност поправљања оштећења изазваних антитуморским средствима [174, 200, 201]. Ћелијски циклус хуманих соматских ћелија траје око 16–24 сата, од тога 6-12 сати ћелија проведе у G1 фаза, 6–8 сати у S фаза и 3–4 сата у G2/M фази, док је плурипотентним матичним ћелијама потребно око 32–38 сати да заврше ћелијски циклус [202, 203].

Слично оксалиплатини, третман комплексом Ru-1 индукује значајну акумулацију CT26 ћелија у G2/M фази, док третман комплексом Ru-2 доводи до заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 фази у поређењу са контролним CT26 ћелијама (**Графикон 18**). Накупљање ћелија у G0/G1 фази често је резултат активирања контролне тачке ћелијског циклуса као последица оштећења ДНК. Досадашње студије

су показале да нека комплексна једињења рутенијума(II) индукују заустављање ћелија у *G0/G1* фази путем активације *p53* и повећањем нивоа протеина *p21*, који блокира активност *CDK* и инхибира ћелијски циклус, што резултује заустављањем индукцијом апоптозе [180, 204] [205].

Третман НСТ116 ћелија са Ru-1 комплексом је довео је до заустављања ћелијског циклуса у *G2/M* фази, док је значајно повећање процента код SW480 ћелија у *S* и у *G2/M* фази забележено након третмана са Ru-2 комплексом (**Графикони 19, 20**). Резултати истраживања у коме је 5-флуороурацил примењен у вишим концентрацијама довео до заустављања ћелијског циклуса у *G1/S* фази и апоптозе ћелија, док у нижим концентрацијама довео до заустављања ћелијског циклуса у *G2/M* фази код SW480 и НСТ116 ћелија, могу послужити за откривање механизма дејства рутенијум(II) комплекса [206]. Анализа ћелијског циклуса mMSCs, након што су биле изложене дејству испитиваних комплекса рутенијум(II), је показала да се 86,93% нетретираних mMSCs налази у *G0/G1* фази, што је у складу са подацима из литературе [207]. Примена оба комплекса рутенијума(II) и оксалиплатине је довела до повећања процента mMSCs у *S* и у *G2/M* фази ћелијског циклуса, при чему је застој у наведеним фазама најизраженији био након примене оксалиплатине (**Графикон 21**), што је у складу са резултатима сличних истраживања у којима цисплатина доводи до заустављања ћелијског циклуса у *G2* и *S* фази mMSCs [196, 197].

5.4. Утицај рутенијум(II) терпирин комплекса на инхибицију раста карцинома колона миша *in vivo*

Ради утврђивања фармаколошке активности неког испитиваног агенса (потенцијалног лека), који се не дистрибуира специфично само у циљана ткива, већ и несцифично у остала здрава ткива, метаболише и елиминише из организма, неопходни су *in vivo* модели [208, 209].

Анимални модели хуманих карцинома могу да послуже за извођење фармаколошких, фармакодинамичких и фармакокинетичких особина испитиваног агенса, за разумевање и расветљавање патофизиологије карцинома, за идентификацију нових, потенцијалних, терапеутских агенаса и истраживање њихових механизма дејства [210].

У спроведеном истраживању је детерминисан туморицидни потенцијал, испитиваних рутенијум(II) терпирин комплекса на анималном моделу карцинома колона *in vivo*. Користили смо хетеротопски модел мишјег карцинома колона индукован субкутаном инјекцијом сингених СТ26 туморских ћелија.

Анализа резултата морфометријских параметара тумора (волумен и тежина тумора) указује на то да рутенијум(II) терпирин комплекси инхибирају раст карцинома колона, при чему је Ru-1 ефикаснији од Ru-2. Свега три дана након прве дозе 5 mg/kg Ru-1 комплекса приликом мерења пречника тумора ради одређивања волумена тумора уочили смо да су тумори из ове групе мањи у односу на туморе из других експерименталних и контролне групе. Овај тренд је задржан до краја експеримента, тако да је у свим данима пресека, тј. одређивања волумена тумора, група која је третирана са Ru-1 комплексом имала значајно мањи волумен тумора, у односу на контролу чак шест пута мањи волумен, а у односу на групу третирану оксалиплатином, три пута мањи волумен тумора. Док је Ru-2 комплекс у дози од 5 mg/kg инхибирао раст тумора *in vivo* подједнакао добро као и оксалиплатина.

Процент инхибиције раста тумора, израчунат према одговарајућој формули, након примене Ru-1 комплекса у дози од 5 mg/kg је износио чак 92,72%, док је тај

процент за Ru-2 комплекс и оксалиплатину у истој дози био 57,81% и 55,69% (**Табела 3**). Према истом протоколу спроведен је још један *in vivo* екперимент у коме су коришћене ниже дозе испитиваних једињења, тачније 2 mg/kg. Запажено је да су до 15. дана екперимента, оба рутенијум(II) терпиридин комплекса примењена у дози од 2 mg/kg постигла подједнак ефекат на инхибицију раста хетеротопског тумора колона као и референто једињење, оксалиплатина (**Графикон 22**). Последњег дана екперимента, оксалиплатина и Ru-1 су остварили готово исти ефекат у сузбијању раста тумора, који је износио 51,39% и 53,41%, док је Ru-2 примењен у дози од 2 mg/kg инхибирао раст тумора за свега 17,56% (**Табела 3**). На основу претходно наведених резултата истраживања може се закључити да Ru-1 поседује добар туморицидни потенцијал *in vivo*.

Док је оксалиплатина остварила туморицидни ефекат *in vivo* независно од примењене дозе, то није био случај са комплексима рутенијума(II), који су показали дозно-зависни туморицидни ефекат. Оксалиплатина је у обе примењене дозе довела до инхибиције раста тумора за око $53 \pm 2,5\%$ у односу на контролу, што је у складу са досадашњим резултатима у којима оксалиплатина чак и у вишим примењеним дозама остварила приближан ефекат у погледу инхибиције раста тумора [211]. Инхибиторни ефекат рутенијум(II) терпиридин комплекса на раст тумора слаби када су примењени у нижој дози, мада је тај ефекат и даље компарабилан са ефектом који остварује оксалиплатина у истој дози. У истраживању сличног дизајна спроведеном на мишевима са тешком комбинованом имунодефицијенцијом, којима су субкутано имплантиране хумане ћелије карцинома колона - НСТ116 и који су интраперитонеално третирани комплексима рутенијума са пипларином, 15 дана у континуитету у дози од 15 $\mu\text{mol/kg}$, почевши један дан након инокулације НСТ116 ћелија, стопа инхибиције раста тумора је била око 30% [212]. У истраживању спроведеном на мишевима BALB/c женског пола, којима је индукован хетеротопски карцином колона - СТ26 и који су интраперитонеално третирани рутенијум(II) комплексима са бензимидазолом као лигандима у дози од 2,5 mg/kg, постигнути су ефекти инхибиције раста тумора *in vivo*, који су у складу са нашим истраживањем [213].

5.5. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на системска оштећења

Испитивањем потенцијалне системске токсичности рутенијум(II) терпиридин комплекса *in vivo* [214], уочено је да ови комплекси када се примене у дози од 5 mg/kg смањују проценат преживљавања, због чега су окарактерисани као врло токсични. Комплекс Ru-1 примењен у дози од 5 mg/kg јесте показао изузетан антитуморски ефекат *in vivo*, али је проценат преживљавања уједно у тој групи био најнижи (66,67%), нешто виши проценат преживелих мишева је био у групу третираној са 5 mg/kg Ru-2 (83,33%), док је у групи мишева који су примали 5 mg/kg оксалиплатине стопа преживљавања била 100% (**Графикон 23**). Ни у једној од експерименталних група није уочен значајнији пад масе, нити значајније промене у маси органа мишева (**Графикони 24-26**), што је у складу са досадашњим истраживањима [212, 215].

Када су рутенијум(II) терпиридин комплекси примењени у нижој дози (2 mg/kg), запажена је смањена системска токсичност уз задржан антитуморски потенцијал. Смањена токсичност се огледала у томе што су сви мишеви преживели експеримент и при том није забележен губитак на маси, а ни релативна маса органа мишева није указивала на системску токсичност рутенијумских комплекса (**Графикони 23-26**).

Оксалиплатина, као и неки комплекси рутенијума могу да узрокују оштећења јетре и бубрега. Процена системске токсичности услед примене поменутих комплекса одређивана је биохемијским и хистопатолошким анализама [216, 217, 218].

У нашем истраживању, нефротоксичност испитиваних комплекса рутенијума и оксалиплатине је процењена одређивањем концентрације урее и креатинина у серуму мишева, чије се вредности користе за процену гломеруларне филтрације и за одређивање оштећења бубрежне функције [219]. За разлику од оксалиплатине и Ru-1 комплекса који нису довели до пораста концентрација креатинина и урее ни у једној од примењених доза, примена Ru-2 у дози од 5 mg/kg је код мишева са СТ26 тумором индуковала пораст поменутих параметара (**Графикон 28**). Чак и након смањења дозе на 2 mg/kg (**Графикон 29**), примена Ru-2 комплекса доводи до повећања вредности урее у односу на контролну групу, као и остале две експерименталне групе, што упућује на то да Ru-2 комплекс изазива оштећење бубрега. Резултат нефротоксичности Ru-2 комплекса је у складу са већ познатом чињеницом да рутенијум(III) комплекс (*NAMI-A*) може да оштетити бубреге, односно да изазива проширење тубула и повреде гломерула као и повишење нивоа креатинина у серуму, испитиваних животиња [216, 102], док рутенијум(III) комплекс (*KP1019*) поред нефротоксичности испољава и токсичне ефекте на костну срж [220].

Процена хепатотоксичности испитиваних комплекса вршена је анализом добијених серумских вредности ензима јетре, АСТ и АЛТ, чије повећање активности указује на поремећену функцију јетре [221]. Комплекси рутенијума(II) су се показали као изузетно хепатотоксични када се примене у дози од 5 mg/kg, док се та изразита токсичност према јетри губи када је доза смањена на 2 mg/kg. Овакав налаз је у складу са досадашњим истраживањима, с обзиром да комплекс рутенијума(III) (*NAMI-A*) такође делује хепатотоксично, што се огледа кроз оштећење архитектуре лобула, отицање синусоида и фокалног замућења епитела код животиња када се примени у дози од 35 mg/kg [98].

Примена оксалиплатине ни у једној од примењених доза није утицала на вредности АСТ и АЛТ (**Графикони 30-32**), што је и очекивано с обзиром на то да је терапија оксалиплатином повезана са ниском стопом пролазног повишења аминотрансфераза у серуму [222]. У сличном истраживању, мишеви са индукованим СТ26 тумором су третирани оксалиплатином која је апликована директно у туморску масу у дози од 10 mg/kg, такође нису имали повишене биохемијске параметре у серуму, што је у складу са подацима које смо добили у нашој студији [223].

Хистопатолошка анализа се сматра примарним тестом за процену токсичног потенцијала супстанци примењених *in vivo*. Хистопатолошка анализа срца, јетре, плућа, бубрега и примарног тумора, указује на присутне реверзибилне и иреверзибилне хистопатолошке промене или повреде ткива. Овакав налаз указује на то да рутенијум(II) терпиридин комплекси подједнако као и оксалиплатина или чак и израженије узрокују токсична оштећења на поменутих органима и некрозу у примарној туморској маси (**Слике 6-14**).

Хистопатолошке промене у ткиву бубрега настале услед примене рутенијум(II) терпиридин комплекса као што су дегенерација епитела тубула и некроза гломерула (**Слике 8, 9**), које су забележене у актуелном истраживању су у складу са резултатима ранијег истраживања у коме је показано да рутенијум(II) комплекси доводе до атрофије гломерула бубрега и дегенерације ћелија проксималних тубула [215]. Јетра је најважнији орган за метаболизам и детоксикацију, али је уједно и мета токсичности многих хемијских супстанци, укључујући лекове. За разлику од истраживања у коме је показано да комплекси рутенијума(II) не доводе до иреверзибилних промена у јетри [215], у актуелном истраживању су откривене промене типа конгестије, дегенерације

хепатоцита и некрозе портне зоне лобулуса услед примене оба рутенијум(II) терпиридин комплекса као и оксалиплатине (Слике 10, 11), што је у складу са другим истраживањима сличног дизајна [98, 212]. Испољена хепатотоксичност оксалиплатине је у складу са постојећим подацима да хемиотерапија оксалиплатином изазива хистолошке промене јетре у виду дилатације синусоида, конгестије и централобуларне некрозе, међутим ове промене најчешће нису клинички значајне током акутне фазе, али могу прогредирати у синусоидални опструкциони синдром. Узрок синусоидалне дилатације и централне конгестије након терапије оксалиплатином није познат, али се сматра да је изазван повредом синусоидалних ендотелних ћелија [222]. За разлику од истраживања у коме комплекси рутенијума(II) не доводе до инфламације и некрозе плућа [215], у нашим истраживањима примена рутенијума(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине је довела до промена у плућима, у виду интерстицијалне и перибронхијалне лимфоцитне инфилтрације, конгестије и руптуре алвеоларних септума (Слике 6, 7), што је у складу са истраживањем у коме су испитивани комплекси рутенијума са пипларином [212]. Међутим, пасивна хиперемичка и покидане алвеоле су биле присутне и у контролној групи, чије присуство може да се објасни етарском наркозом [224].

Хистолошка анализа ткивних узорака срца указује на кардиотоксичне ефекте испитиваних рутенијум(II) комплекса, који су дозно зависни. Односно, примена рутенијум(II) комплекса у дози од 5 mg/kg довела је до пасивне хиперемичке, хипертрофије, дегенеративних промена кардиомиоцита и фокалне коагулационе некрозе миокарда. Док је проширење интерстицијума забележено у свим групама, укључујући и контролну групу (Слика 12). Блаже промене у срчаном ткиву (хипертрофија мишићних влакана са хомогенизацијом саркоплазме и проширењем интерстицијума уз лимфоцитни запаљенски инфилтрат периваскуларно) забележене су након третмана мишева испитиваним рутенијум(II) комплексима и оксалиплатином у дози од 2 mg/kg (Слика 13).

Патохистолошка анализа тумора из свих третираних група, али и контролне групе, указује на наглашена поља некрозе географског типа, што је у корелацији са резултатима истраживања која су показала да комплекси рутенијума са пипларином као лигандом, такође доводе до екстензивне некрозе тумора (Слика 14) [212].

Периферна неуротоксичност је једно од главних нежељених дејстава платинских комплекса, а посебно карактеристично за оксалиплатину и испољава се болом, атаксијом и сензорним оштећењем. У већини истраживања спроведених са комплексима рутенијума није испитивана њихова потенцијална периферна неуротоксичност *in vivo*, али у једном истраживању у ком је испитивана, резултати указују на то да рутенијум(II) терпиридин комплекси не утичу значајно на проводљивост сензорних нерава [225]. У актуелној студији, спровели смо тест вруће плоче, како бисмо проценили периферну неуротоксичност код мишева који су третираны комплексима рутенијума(II) или оксалиплатином. Тест са врућом плочом коришћен је за откривање латенције на болну (топлотну) сензацију, која може указивати на повреду или периферну сензорну неуротоксичност [226]. Помоћу овог теста није забележена разлика у понашању мишева постављених на врућу плочу, из третираних група у односу на контролну групу. Међутим, с обзиром на познату чињеницу да BALB/c мишеви имају повећан праг осетљивости на термални стимулус [168], па тако чак ни здрави мишеви нису реаговали на топлоту, не можемо проценити да ли је дошло до развоја сензорне неуропатије код мишева који су примали рутенијум(II) терпиридин комплексе или оксалиплатину.

5.6. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на заступљеност појединих ћелија имунског система у периферној крви

Испитали смо утицај примене рутенијум(II) терпиридин комплекса и оксалиплатине у дози од 5 mg/kg на заступљеност појединих ћелија имуног система у периферној крви код здравих мишева, као и код мишева којима је индукован хетеротопски карцином колона. Имуни систем има битну улогу у превенцији, развоју и расту тумора. Ћелије урођеног и стеченог имунитета имају способност да препознају и уклоне туморске ћелије [227, 228], а поједини металофармацеутици имају способност да тај феномен додатно стимулишу [229].

Када дође до малигне трансформације ћелије, ћелија експримира одговарајуће молекуле на површини ћелијске мембране, који упозоравају имуни систем и позивају на то да је треба уклонити. Овако измењене ћелије бивају препознате од стране цитотоксичних CD8⁺ Т ћелија, дендритских ћелија (DC) или NK ћелија [230]. NK ћелије се сматрају кључним компонентама урођеног имуног одговора у борби против малигно-трансформисаних ћелија. Када NK ћелија ступи у директан контакт са туморском ћелијом и препозна је као измењену ћелију, врло брзо се активира и индукује апоптозу туморских ћелија посредовану перфорином и гранзимом В или путем лиганда смрти. Ако је пак NK ћелија активирана посредством цитокина или интерферона, она почиње да секретује IFN- γ и TNF- α који поспешују фагоцитозу [231]. DC представљају специјализовану популацију антиген презентујућих ћелија које фагоцитишу умируће туморске ћелије, обрађују их и презентују туморске антигене CD8⁺ Т ћелијама, CD4⁺ Т ћелијама, NKT ћелијама или В ћелијама. Активирани ефекторске Т ћелије затим секретују про-инфламаторни цитокин - IFN- γ , који је од круцијалне важности за инхибицију пролиферације тумора и ангиогенезу [230]. CD8⁺ Т ћелије изазивају апоптозу у ћелијама тумора на сличан начин као што то постижу NK ћелије. Ћелије стеченог имунитета доводе до елиминације преосталих ћелија тумора и стварања имунолошке меморије на специфичне компоненте тумора како би се спречили рецидиви тумора [232]. Моноцити имају способност да фагоцитишу инфициране и умируће ћелије, али имају улогу и у стеченом имунитету, било директним активирањем Т ћелија или диференцирањем у макрофаге и DC које могу да индукују пролиферацију CD8⁺ Т ћелија и регулишу активацију CD4⁺ Т ћелија [233]. Моноцити који су окарактерисани као Lybс⁺, CD11b⁺, CD11c⁻ су инфламаторни моноцити који производе TNF- α . Популација моноцита окарактерисана присуством маркера: CD11b⁺, CD11c⁺ и одсуством маркера Lybс⁻, која има улогу у раном имунолошком одговору, неоваскуларизацији и регенерацији ткива [234], била је процентуално заступљенија код здравих мишева који су третирани Ru-1 комплексом (**Графикони 34, 35**). У спроведеној студији, процентуална заступљеност NK ћелија и NKT ћелија је убедљиво била највиша у обе групе мишева који су третирани са 5 mg/kg Ru-1 комплекса, односно како код здравих мишева, тако и код мишева са индукованим хетеротопским карциномом колона, с тим да је додатно код мишева са индукованим СТ26 тумором, који су примали Ru-1 комплекс забележен и повећан проценат цитотоксичних CD8⁺ Т лимфоцита у поређењу са свим осталим групама (**Графикон 33**). Овакав ефекат сугерише на то да Ru-1 комплекс своје антитуморско дејство *in vivo* остварује делом и посредством ћелија имуног система. Ранија истраживања спроведена на моделу карцинома колона СТ26 су показала да индукција NK ћелија посредована DC може бити од користи у превенцији метастаза након хируршке ресекције примарног тумора, али не и у лечењу [235]. Оксалиплатина у дози од 5 mg/kg је са друге стране довела до значајног пада процента моноцита и неутрофила код мишева са индукованим карциномом колона у односу на све остале групе и код здравих мишева којима је

апликована оксалиплатина је такође забележен пад моноцита у односу на контролну групу и групу третирану Ru-1 комплексом, и овакав резултат је у складу са постојећим подацима који указују на појаву неутропеније и моноцитопеније код пацијената који су на терапији оксалиплатином [236, 237] (**Графикони 34, 35**).

5.7. Утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на редоск статус у ткиву

Оксидациони стрес је стање које настаје услед повећане продукције слободних радикала или смањеног дејства антиоксидационе заштите [238]. Оксидациони стрес представља нормалну појаву на нивоу ћелије и ткива, јер је уско повезан са процесима стварања енергије у ћелији, одбраном од патогена и неким врстама ћелијске сигнализације. Оксидациони стрес може проузроковати разноврсна оштећења ћелије и њених финих структура, дисрегулацију метаболичких путева, путева преживљавања и сигналних каскада [239]. Посебан значај оксидационог стреса се огледа у еволуцији малигне трансформације, где представља како узрок, тако и пратећу појаву која је карактеристика метаболизма малигне ћелије [240]. Повишен ниво ROS омогућава ћелијама карцинома да промовишу про-туморску сигнализацију, мада је прекомерна продукција ROS повезана са анти-туморским дејством, односно оксидациони стрес индукован цитостатицима може довести до смрти ћелија карцинома [241].

У нашим истраживањима, процену утицаја примене комплекса рутенијума(II) на маркере оксидационог стреса и систем антиоксидационе заштите, извршили смо на основу анализе добијених вредности TBARS, GSH, SOD и CAT у хомогенату ткива срца, јетре, плућа, бубрега и тумора.

Значајан скок нивоа TBARS у бубрежном ткиву мишева који су третирани са Ru-2 у односу на све остале експерименталне групе и пад нивоа GSH (трошење антиоксиданса) у бубрезима указују на потенцијално оксидационо оштећење бубрега услед примене 5 mg/kg Ru-2, која је иначе била пропраћена скоком урее и креатинина и хистопатолошким променама у ткиву бубрега.

У нашем истраживању, највиши ниво TBARS у ткиву тумора забележен је у групи нетретираних мишева, док је ниво TBARS у ткиву тумора мишева третираних оксалиплатином био виши у поређењу са групама које су третиране рутенијум(II) терпиридинским комплексима (**Графикон 36**). Ови резултати су у корелацији са резултатима сличних истраживања са рутенијум(II) комплексима [242], [243]. Због брзог раста тумори троше кисеоник и друге хранљиве материје брже од здравог ткива, а развој нових крвних судова често не може да прати раст тумора, што за последицу има нижи садржај O₂ у ћелијама тумора [244, 245, 246]. Стога, ROS имају другачију улогу у туморима него у здравом ткиву, због хипоксије, промене рН вредности и повећане експресије трансферина у микроокружењу тумора. Ензим SOD обезбеђује заштиту ћелија од оксидационог оштећења катализом дисмутације O₂⁻ до H₂O₂ и O₂ [247]. У спроведеном истраживању забележена је снижена активност SOD у туморском ткиву свих третираних група у односу на контролу, што је у складу са постојећим сазнањем да се активност SOD повећава са напредовањем стадијума болести, односно очекивано је да активност SOD у ткиву карцинома колона који није третиран буде повећана [248, 249, 250].

Плућно ткиво је директно изложено високом притиску кисеоника, као и повећаном ендогеном и егзогеном оксидационом стресу. Активност ензима антиоксидационе заштите - CAT и SOD, као и ниво неензимског антиоксиданса – GSH су били значајно повишени у плућима мишева који су третирани рутенијум(II) терпиридин комплексима у поређењу са контролном групом (**Графикони 37-39**). GSH заједно са глутатион S-трансферазом штити ћелијске компоненте од антитуморских

лекова или оксидационог стреса, тако што детоксикују липидне хидропероксиде [251] [247, 252]. Иако се на први поглед чини да је примена комплекса рутенијума(II) довела до значајног повећања активности SOD, CAT и GSH у плућима, што би указало на њихова потенцијална антиоксидациона својства, појачана антиоксидациона заштита може да се тумачи и као одбрамбени механизам [253]. Ова хипотеза је додатно поткрепљена чињеницом да диетилетар, који је у нашем истраживању коришћен као анестетик при жртвовању мишева, оштећује плућно ткиво [224], чиме је могуће објаснити присутне промене и у плућима мишева из контролне групе.

Третман оксалиплатином је довео до дисбаланса редокс хомеостазе у јетри, који се огледао у смањеној активности SOD и CAT и нивоу GSH (**Графикони 37-39**), што је у складу са досадашњим истраживањима [254, 248]. Индекс липидне пероксидације (TBARS) у јетри мишева из све три експерименталне групе је био нижи него у контролној групи. Овакав резултат јесте неочекиван с обзиром на то да су сви испитивани комплекси испољили одређен хепатотоксични потенцијал, али је описан и код других комплекса рутенијума [253, 242].

Повишен ниво TBARS у срцу мишева третираних комплексима рутенијума(II) указује на оштећење ћелија срца (**Графикон 36**), што корелира са резултатима хистопатолошке анализе срца и у складу је са резултатима истраживања сличног дизајна [255]. С друге стране, резултати истраживања које су спровели Михајловић и колеге [256] у коме је испитиван утицај рутенијум(II) терпиридин комплекса на редокс статус код пацова, указују да ови комплекси имају низак потенцијал да доведу до редокс дисбаланса.

6. ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу анализе добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси испољавају цитотоксичан ефекат *in vitro*, који је компарабилан са ефектом који остварује оксалиплатина (референтни хемиотерапеутик), према свим тестираним туморским ћелијским линијама:
 - ћелијама карцинома колона изолованим из BALB/c мишева - CT26,
 - ћелијама хуманог епителног колоректалног аденокарцинома - SW480,
 - ћелијама хуманог епителног колоректалног карцинома - HCT116.
2. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси испољавају израженије цитотоксичано дејство од оксалиплатине *in vitro* према мезенхималним матичним ћелијама изолованим из костне сржи C57Bl/6 мишева – mMSC, које поседују протуморски потенцијал и имају улога у развоју резистенције на хемиотерапеутике.
3. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују цитотоксичан ефекат *in vitro* посредством индукције некрозе ћелије и инхибицијом прогресије ћелијског циклуса, доминантно заустављањем ћелијског циклуса у G2/M фази.
4. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси инхибирају раст хетеротопског карцинома колона миша након интраперитонеалне примене.
 - Ru-1 комплекс је потентнији антитуморски агенс од Ru-2 комплекса.
 - Ru-1 комплекс у дози од 2 mg/kg инхибира раст карцинома колона миша подједнако као и оксалиплатина, док у дози од 5 mg/kg супримира раст карцинома колона миша боље од оксалиплатине.
5. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси испољавају дозно-зависну хепатотоксичност, нефротоксичност и кардиотоксичност.
6. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси доводе повећане заступљености ћелија урођеног (NK и NKT ћелија) и стеченог имунитета (CD8⁺ Т лимфоцита) у периферној крви третираних мишева, које имају значајну улогу у препознавању и елиминацији туморских ћелија.
7. Испитивани рутенијум(II) терпиридин комплекси доводе до редокс дисбаланса у појединим ткивима третираних мишева (повишен индекс липидне пероксидације у ткивима срца и бубрега). Овакав налаз указује на то да је један од могућих механизма којим рутенијум(II) терпиридин комплекси остварују системске токсичне ефекте, управо индуковање оксидационог стреса.

7. ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Moore PK. "Pharmacology," 5th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003.
2. <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>. Посећено дана: 30.09.2021.
3. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am.* 1996;275(3):62-70.
4. Favoni RE, de Cupis A. The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacol Rev.* 2000;52(2):179-206.
5. Strieter RM. Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nat Immunol.* 2001;2(4):285-286.
6. Rahman N. Realizing the promise of cancer predisposition genes. *Nature.* 2014;510(7503):176.
7. Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1551(2):F1-37.
8. Buys CH. Telomeres, telomerase, and cancer. *N Engl J Med.* 2000;342(17):1282-1283.
9. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407(6801):249-257.
10. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):563-572.
11. Lee HY, Hong IS. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci.* 2017;108(10):1939-1946.
12. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells.* 2011;29(1):5-10.
13. Dazzi F, Lopes L, Weng L. Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? *Immunology.* 2012;137(3):206-213.
14. Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death and Differentiation.* 2012;19(9):1505–1513.
15. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013;13(4):392-402.
16. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):141–150.
17. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?. *Stem Cells.* 2011;29(1):11-19.
18. Rhee KJ, Lee JI, Eom YW. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):30015-30033.
19. Connolly JL, Schnitt SJ, Wang HH, et al. Tumor Structure and Tumor Stroma Generation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine.* 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. >Доступно на: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13447/> Посећено дана: 15.06.2021.
20. Hale MD, Hayden JD, Grabsch HI. Tumour-microenvironment interactions: role of tumour stroma and proteins produced by cancer-associated fibroblasts in chemotherapy response. *Cell Oncol (Dordr).* 2013;36(2):95-112.
21. Funk JO. Cancer cell cycle control. *Anticancer Res.* 1999;19(6A):4772-4780.

22. Николић И и сар. Ембриологија човека (треће издање). Дата статус, Београд, 2007, 57-67.
23. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.
24. Israels ED, Israels LG. The Cell Cycle. *Stem Cells.* 2001;19:88-91.
25. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000;2(4):291-299.
26. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:217-245.
27. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S37-43.
28. Alessio E, Messori L. The Deceptively Similar Ruthenium(III) Drug Candidates KP1019 and NAMI-A Have Different Actions. What Did We Learn in the Past 30 Years? *Met Ions Life Sci.* 2018;18:/books/9783110470734/9783110470734-007/9783110470734-011.xml.
29. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* 2010;2010:214074.
30. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12):a006080.
31. Brown K, Awan NA, Le PH, Wilson AM. Histology, Cell Death. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526045/> Посећено дана: 01.04.2021.
32. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000;10(9):369-377.
33. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-776.
34. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 2010;37(3):299-310.
35. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):46-55.
36. Günther C, Martini E, Wittkopf N, Amann K, Weigmann B, Neumann H, Waldner MJ, Hedrick SM, Tenzer S, Neurath MF, Becker C. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature.* 2011;477(7364):335-339.
37. Parsons MJ, Green DR. Mitochondria and apoptosis: a quick take on a long view. *F1000 Biol Rep.* 2009;1:17.
38. Beresewicz M, Kowalczyk JE, Zabłocka B. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate and ryanodine receptors in vivo after transient brain ischemia in gerbils. *Neurochem. Int.* 2006;48(6-7):568-571.
39. Tait SW, Ichim G, Green DR. Die another way-non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell. Sci.* 2014;127(Pt 10):2135-2144.
40. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer.* 1985;55(10):2303-12306.
41. Jungwirth U, Xanthos DN, Gojo J, Bytzek AK, Körner W, Heffeter P, et al Abramkin SA, Jakupec MA, Hartinger CG, Windberger U, Galanski M, Keppler BK, Berger W. Anticancer activity of methyl-substituted oxaliplatin analogs. *Mol Pharmacol.* 2012;81(5):719-728.
42. Shimizu T, Abu Lila AS, Nishio M, Doi Y, Ando H, Ukawa M, Ishima Y, Ishida T. Modulation of antitumor immunity contributes to the enhanced therapeutic efficacy of liposomal oxaliplatin in mouse model. *Cancer Sci.* 2017;108(9):1864-1869.
43. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, Ghiringhelli F, di Virgilio F, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy-

- dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*. 2011;334(6062):1573-1577.
44. Chang CL, Hsu YT, Wu CC, Lai YZ, Wang C, Yang YC, Wu TC, Hung CF. Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response. *Cancer Res*. 2013;73(1):119-127.
 45. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1136-1151.
 46. Nebot-Bral L, Brandao D, Verlingue L, Rouleau E, Caron O, Despras E, El-Dakdouki Y, Champiat S, Aoufouchi S, Leary A, Marabelle A, Malka D, Chaput N, Kannouche PL. Hypermutated tumours in the era of immunotherapy: The paradigm of personalised medicine. *Eur J Cancer*. 2017;84:290-303.
 47. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, Signori E, Honoki K, Georgakilas AG, Amin A, Helferich WG, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bilslund A, Bhakta D, Halicka D, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Nowsheen S, Yang X, Choi BK, Kwon BS. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*. 2015;35 Suppl:S185-S198.
 48. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-271.
 49. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016;279(6):541-562.
 50. Malmberg KJ, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol*. 2017;31:20-29.
 51. Cao G, Wang J, Zheng X, Wei H, Tian Z, Sun R. Tumor Therapeutics Work as Stress Inducers to Enhance Tumor Sensitivity to Natural Killer (NK) Cell Cytolysis by Up-regulating NKp30 Ligand B7-H6. *J Biol Chem*. 2015;290(50):29964-29973.
 52. Englinger B, Pirker C, Heffeter P, Terenzi A, Kowol CR, Keppler BK, Berger W. Metal Drugs and the Anticancer Immune Response. *Chem Rev*. 2019;119(2):1519-1624.
 53. Terenzi A, Pirker C, Keppler BK, Berger W. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death. *J Inorg Biochem*. 2016;165:71-79.
 54. Ray PD, Huang BW and Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*. 2012;24:981-990.
 55. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 2016;7(29):44879-44905.
 56. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*. 2004;3(4):294-230.
 57. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-295.
 58. Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci*. 2011;5:709.
 59. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 2010;48:909-930.
 60. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci*. 1996;93:9782-9787.
 61. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1991;266:22028-22034.

62. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001;1:529–539.
63. Asaduzzaman Khan M, Tania M, Zhang DZ, Chen HC. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese J Cancer Res.* 2010;22:87–92.
64. Cobanoglu U, Demir H, Duran M, Sehitoğullari A, Mergan D, Demir C. Erythrocyte catalase and carbonic anhydrase activities in lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010;11:1377–1382.
65. Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc.* 2005;64:527–542.
66. Cheng TC, Hsu YW, Lu FJ, Chen YY, Tsai NM, Chen WK, Tsai CF. Nephroprotective effect of electrolyzed reduced water against cisplatin-induced kidney toxicity and oxidative damage in mice. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(2):119–126.
67. Zalewska-Ziob M, Adamek B, Kasperczyk J, Romuk E, Hudziec E, Chwalińska E, Dobija-Kubica K, Rogoziński P, Bruliński K. Activity of Antioxidant Enzymes in the Tumor and Adjacent Noncancerous Tissues of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:2901840.
68. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn.* 2004;8:141–149.
69. Baek IJ, Seo DS, Yon JM, et al. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol.* 2007;38:237–244.
70. Liang H, Ran Q, Jang YC, et al. Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria. *Free Radical Biol Med.* 2009;47:312–320.
71. Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1255–H1261.
72. Bruijninx PC, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12(2):197–206.
73. Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann Pharm Fr.* 2011;69(6):286–295.
74. Lippard SJ. New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. *Science.* 1982;218(4577):1075–1082.
75. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2014;5(5):e1257.
76. Makovec T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol.* 2019;53(2):148–158.
77. Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;6:73(suppl 1):e478s.
78. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008;6(1):1–18.
79. Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol.* 2014;19:144–153.
80. Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(1):11–12.

81. Devanabanda B, Kasi A. Oxaliplatin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557690/#article-26481.s1>
82. Pedrosa P, Carvalho A, Baptista PV, Fernandes AR (2018). Inorganic Coordination Chemistry: Where We Stand in Cancer Treatment?, Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordination Chemistry, Takashiro Akitsu, IntechOpen. Доступно на: <https://www.intechopen.com/chapters/62941>
83. van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today*. 2009;14(23-24):1089-1097.
84. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Zorodduet MA. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*. 2015; 284:329-350.
85. Levina A, Mitra A, Lay PA. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics*. 2009;1(6):458-470.
86. Keppler BK, Rupp W. Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III). A representative of a new class of inorganic antitumor agents. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1986;111(2):166-168.
87. Garzon FT, Berger MR, Keppler BK, Schmähl D. Comparative antitumor activity of ruthenium derivatives with 5'-deoxy-5-fluorouridine in chemically induced colorectal tumors in SD rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1987;19(4):347-349.
88. Berger MR, Garzon FT, Keppler BK, Schmähl D. Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats. *Anticancer Res*. 1989;9(3):761-765.
89. Bacac M, Hotze AC, van der Schilden K, Haasnoot JG, Pacor S, Alessio E, Sava G, Reedijk J. The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: an NMR evaluation. *J Inorg Biochem*. 2004;98(2):402-412.
90. Heffeter P, Bock K, Atil B, Reza Hoda MA, Korner W, Bartel C et al. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339. *J Biol Inorg Chem*. 2010;15:737-748.
91. Alessio E, Messori L. The Deceptively Similar Ruthenium(III) Drug Candidates KP1019 and NAMI-A Have Different Actions. What Did We Learn in the Past 30 Years? *Met Ions Life Sci*. 2018;18:/books/9783110470734/9783110470734-007/9783110470734-011.xml.
92. Henke MM, Richly H, Drescher A, Grubert M, Alex D, Thyssen D, Jaehde U, Scheulen ME, Hilger RA. Pharmacokinetic study of sodium trans[tetrachlorobis(1H-indazole)-ruthenate (III)]-indazole hydrochloride (1:1.1) (FFC14A) in patients with solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009 ;47(1):58-60.
93. Peti W, Pieper T, Sommer M, Keppler BK, Giester G. Synthesis of Tumor-Inhibiting Complex Salts Containing the Anion trans-Tetrachlorobis(indazole)ruthenate(III) and Crystal Structure of the Tetraphenylphosphonium Salt. *Eur J Inorg Chem*. 1999, 1551-1555.
94. Trondl R, Heffeter P, Kowol CR, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem Sci*. 2014, 5, 2925-2932.
95. Burris HA, Bakewell S, Bendell JC, Infante J, Jones SF, Spigel DR, Weiss GJ, Ramanathan RK, Ogden A, Von Hoff D. Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase I study with expansion cohort. *ESMO Open*. 2017;1(6):e000154

96. Sava G, Pacor S, Mestroni G, Alessio E. Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im], a metal complex of ruthenium with antimetastatic properties. *Clinical & Experimental Metastasis*. 1992;10(4):273-280.
97. Sava G, Pacor S, Mestroni G, Alessio E. Effects of the Ru(III) complexes [mer-RuCl₃(DMSO)₂Im]degrees and Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im] on solid mouse tumors. *Anti-cancer Drugs*. 1992;3(1):25-31.
98. Bergamo A, Gagliardi R, Scarzia V, et al. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(1):559-564.
99. Sava G, Capozzi I, Clerici K, Gagliardi R, Alessio E, Mestroni G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. *Clin Exp Metastasis*. 1998;16:371–379.
100. Gava B, Zorzet S, Spessotto P, Cocchietto M, Sava G. Inhibition of B16 Melanoma Metastases with the Ruthenium Complex Imidazolium trans-Imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and Down-Regulation of Tumor Cell Invasion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006, 317, 284–291.
101. Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans*. 2007, 1267–1272.
102. Sava G, Bergamo A, Zorzet S, Gava B, Casarsa C, Cocchietto M, Furlani A, Scarzia V, Serli B, Iengo E, Alessio E, Mestroni G. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. *Eur J Cancer*. 2002;38:427-435.
103. Pacor S, Zorzet S, Cocchietto M, Bacac M, Vadori M, Turrin C, Gava B, Castellarin A, Sava G. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004, 310, 737–744.
104. Rademaker-Lakhai JM, van den Bongard D, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin Cancer Res*. 2004;10(11):3717-3727.
105. Cocchietto M, Sava G. Blood concentration and toxicity of the antimetastasis agent NAMI-A following repeated intravenous treatment in mice. *Pharmacology & Toxicology*. 2000;87(5):193-197.
106. Leijen S, Burgers SA, Baas P, Pluim D, Tibben M, van Werkhoven E, Alessio E, Sava G, Beijnen JH, Schellens JH. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Invest New Drugs*. 2015;33(1):201-214.
107. Lin K, Zhao ZZ, Bo HB, Hao XJ, Wang JQ. Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy. *Front Pharmacol*. 2018;9:1323.
108. Liang JX, Zhong HJ, Yang G, Vellaisamy K, Ma DL, Leung CH. Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity. *J Inorg Biochem*. 2017;177:276-286.
109. Allardyce CS, Dyson PJ, Ellis DJ, Heath SL. Ru (n6-pcymene) Cl₂ (pta) decane: a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells. *Chem Commun*. 2001;15:1396-1397.
110. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem Rev*. 1999;99(9):2511-2534.
111. Abid M, Shamsi, F, Azam A. Ruthenium complexes: an emerging ground to the development of metallopharmaceuticals for cancer therapy. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16:772–786.

112. Luck AN, Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: focus on serum transferrin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(8):1012-1019.
113. Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(3):291-317.
114. Kratz F, Hartmann M, Keppler B, Messori L. The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2581-2588.
115. Pongratz M, Schluga P, Jakupec MA, Arion VB, Hartinger CG, Allmaier G and Keppler BK. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J Anal At Spectrom.* 2004;19:46-51.
116. Dömötör O, Hartinger CG, Bytzek AK, Kiss T, Keppler BK, Enyedy EA. Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies. *J Biol Inorg Chem.* 2013;18(1):9-17.
117. Spreckelmeyer S, Orvig C, Casini A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. *Molecules.* 2014;19(10):15584-15610.
118. Bijelic A, Theiner S, Keppler BK, Rompel A. X-ray Structure Analysis of Indazolium trans-[Tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019) Bound to Human Serum Albumin Reveals Two Ruthenium Binding Sites and Provides Insights into the Drug Binding Mechanism. *J Med Chem.* 2016;59(12):5894–5903.
119. Bergamo A, Messori L, Piccioli F, Cocchietto M, and Sava G. Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin. *Invest New Drugs.* 2003;21:401–411.
120. Liu M, Lim ZJ, Gwee YY, Levina A, Lay PA. Characterization of a ruthenium(III)/NAMI-A adduct with bovine serum albumin that exhibits a high anti-metastatic activity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(9):1661-1664.
121. Novohradský V, Bergamo A, Cocchietto M, et al. Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003).* 2015;44(4):1905-1913.
122. Alessio E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur J Inorg Chem.* 2017, 1549–1560.
123. Malina J, Novakova O, Keppler BK, Alessio E, Brabec V. Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. *J Biol Inorg Chem.* 2001;6(4):435-445.
124. Zhang P, Wang J, Huang H, Qiao L, Ji L, and Chao H. Chiral ruthenium(II) complexes with phenolic hydroxyl groups as dual poisons of topoisomerases I and II α . *Dalton Trans.* 2013;42:8907–8917.
125. Liao G, Chen X, Wu J, Qian C, Wang Y, Ji L, et al. Ruthenium(II) polypyridyl complexes as dual inhibitors of telomerase and topoisomerase. *Dalton Trans.* 2015;44:15145–15156.
126. Puckett CA, and Barton JK. Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes. *J Am Chem Soc.* 2007;129:46–47.
127. Groessl M, Zava, O and Dyson PJ. Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin. *Metallomics.* 2011;3:591–599.

128. Wang JQ, Zhang PY, Qian C, Hou XJ, Ji LN and Chao H. Mitochondria are the primary target in the induction of apoptosis by chiral ruthenium(II) polypyridyl complexes in cancer cells. *J Biol Inorg Chem*. 2014;19:335–348.
129. Wan D, Tang B, Wang YJ, Guo BH, Yin H, Yi QY, et al. Synthesis and anticancer properties of ruthenium (II) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. *Eur J Med Chem*. 2017;139:180–190.
130. Fernandez A, Ordonez R, Reiter RJ, Gonzalez-Gallego J, and Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J Pineal Res*. 2015;59:292–307.
131. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3460-3470.
132. Deng Z, Gao P, Yu L, Ma B, You Y, Chan L, et al. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. *Biomaterials*. 2017;129:111–126.
133. Thota S, Rodrigues DA, Crans DC, Barreiro EJ. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J Med Chem*. 2018;61(14):5805-5821.
134. Biersack B, Zoldakova M, Effenberger K, Schobert R. (Arene)Ru(II) complexes of epidermal growth factor receptor inhibiting tyrophostins with enhanced selectivity and cytotoxicity in cancer cells. *Eur J Med Chem*. 2010;45(5):1972-1975.
135. Luo Z, Yu L, Yang F, Zhao Z, Yu B, Lai H, Wong KH, Ngai SM, Zheng W, Chen T. Ruthenium polypyridyl complexes as inducer of ROS-mediated apoptosis in cancer cells by targeting thioredoxin reductase. *Metallomics*. 2014;6(8):1480-1490.
136. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*. 2012;2012:645460.
137. Stankovic JSK, Selakovic D, Mihailovic V, Rosic G. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Neurotoxicity Induced by Platinum-Based Chemotherapeutics-A Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7753.
138. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2010;2(11):2490-2518.
139. Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1462802.
140. Volarevic V, Djokovic B, Jankovic MG, Harrell CR, Fellabaum C, Djonov V, Arsenijevic N. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):25.
141. Waseem M, Bhardwaj M, Tabassum H, Raisuddin S, Parvez S. Cisplatin hepatotoxicity mediated by mitochondrial stress. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38(4):452-459.
142. Hakiminia B, Goudarzi A, Moghaddas A. Has vitamin E any shreds of evidence in cisplatin-induced toxicity. *J Biochem Mol Toxicol*. 2019;33(8):e22349.
143. El-Awady el-SE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol*. 2011;650(1):335-341.
144. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S. Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther*. 2012; 6(3):147-156.
145. McWhirter D, Kitteringham N, Jones RP, Malik H, Park K, Palmer D. Chemotherapy induced hepatotoxicity in metastatic colorectal cancer: a review of mechanisms and outcomes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(2):404-415.

146. Lazic D, Arsenijevic A, Puchta R, Bugarcic ZD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(ii) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016;45(11):4633-4646.
147. Milutinovic MM, Rilak A, Bratsos I, Klisuric O, Vranes M, Nevenka G, et al. New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. *J Inorg Biochem.* 2017;169:1-12.
148. Masters JR, Stacey GN. Changing medium and passaging cell lines. *Nat Protoc* 2007;2:2276-2284.
149. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015;111:A3.B.1-3.
150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
151. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS One.* 2011;6(11).
152. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;17;184(1):39-51.
153. Anchuri SS, Thota S, Yerra R, Devarakonda KP, Dhulipala S. Novel mononuclear ruthenium(II) compounds in cancer therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(7):3293-3298.
154. Göschl S, Schreiber-Brynzak E, Pichler V, Cseh K, Heffeter P, Jungwirth U, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK. Comparative studies of oxaliplatin-based platinum(iv) complexes in different in vitro and in vivo tumor models. *Metallomics.* 2017;9(3):309-322.
155. Gou HF, Huang J, Shi HS, Chen XC, Wang YS. Chemo-immunotherapy with oxaliplatin and interleukin-7 inhibits colon cancer metastasis in mice. *PLoS One.* 2014;21;9(1).
156. Tan S, Peng X, Peng W, Zhao Y, Wei Y. Enhancement of oxaliplatin-induced cell apoptosis and tumor suppression by 3-methyladenine in colon cancer. *Oncol Lett.* 2015;9(5):2056-2062.
157. Селаковић Д, „Бихевиорални ефекти хроничне примене супрафизиолошких доза андрогених анаболичких стероида и програмираног тренажног процеса код пацова“. Докторска дисертација, Крагујевац, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 2018.
158. Melo AS, Monteiro MC, da Silva JB, de Oliveira FR, Vieira JL, de Andrade MA, Baetas AC, Sakai JT, Ferreira FA, Cunha Sousa PJ, Maia Cdo S. Antinociceptive, neurobehavioral and antioxidant effects of Eupatorium triplinerve Vahl on rats. *J Ethnopharmacol.* 2013;147(2):293-301.
159. Bannon AW, Malmberg AB. 2007. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 8, Unit 8.9
160. Stojic IM, Zivkovic VI, Srejavic IM, Nikolic TR, Jeremic NS, Jeremic JN, Djuric DM, Jovicic N, Radonjic KG, Bugarcic ZD, Jakovljevic VLJ, Novokmet SS. Cisplatin and cisplatin analogues perfusion through isolated rat heart: the effects of acute application on oxidative stress biomarkers. *Mol Cell Biochem.* 2018;439(1-2):19-33.
161. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-358.

162. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980;38:161-170
163. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia, Grune & Stratton:PA. 1984;83-85.
164. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882-888.
165. Zhang JX, Yang ZR, Wu DD, Song J, Guo XF, Wang J, Dong WG. Suppressive effect of sinomenine combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma cell growth. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(16):6737-6743.
166. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175-191.
167. Liu SH, Zhao JH, Deng KK, Wu Y, Zhu JW, Liu QH, Xu HH, Wu HF, Li XY, Wang JW, Guo QF. Effect of radiation on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of human osteosarcoma MG-63 induced by a ruthenium (II) complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;140:202-209.
168. Mogil JS. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):7744-7751. Review.
169. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:452-458.
170. Martell RE, Brooks DG, Wang Y, Wilcoxon K. Discovery of novel drugs for promising targets. *Clin Ther*. 2013;35:1271-1281.
171. Gouveia M, FiGueira J, Jardim MG, Castro R, Tomás H, Rissanen K, RodriGues J. Poly(alkylideneimine) Dendrimers Functionalized with the OrGanometallic Moiety $[Ru(\eta^5-C_5H_5)(PPH_3)_2]^+$ as PromisinG DruGs AGainst Cisplatin-Resistant Cancer Cells and Human Mesenchymal Stem Cells. *Molecules*. 2018;23(6):1471.
172. Maes M, Vanhaecke T, Cogliati B, Yanguas SC, Willebrords J, Rogiers V, et al. Measurement of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Primary Hepatocyte Cultures. *Methods Mol Biol*. 2015;1250:349-361.
173. Chan F, Moriwaki K, De Rosa M. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2013;979:65-70.
174. Wang Y, Bian L, Chakraborty T, Ghosh T, Chanda P, Roy S. Construing the Biochemical and Molecular Mechanism Underlying the In Vivo and In Vitro Chemotherapeutic Efficacy of Ruthenium-Baicalein Complex in Colon Cancer. *Int J Biol Sci*. 2019;22;15(5):1052-1071.
175. Yokoo S, Masuda S, Yonezawa A, Terada T, Katsura T, Inui K. Significance of organic cation transporter 3 (SLC22A3) expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(11):2299-2306.
176. Mallepally RR, Chintakuntla N, Putta VR, Nagasuryaprasad K, Vuradi RK, Madhuri P, et al. Synthesis, Spectral Properties and DFT Calculations of new Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes; DNA Binding Affinity and in Vitro Cytotoxicity Activity. *J Fluoresc*. 2017;27(4):1513-1530.
177. D'Sousa Costa CO, Araujo Neto JH, Baliza IRS, Dias RB, de F Valverde L, Vidal MTA, et al. Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. *Oncotarget*. 2017;8(61):104367-104392.
178. Mühlgassner G, Bartel C, Schmid WF, Jakupec MA, Arion VB, Keppler BK. Biological activity of ruthenium and osmium arene complexes with modified paullones in human cancer cells. *J Inorg Biochem*. 2012;116(5):180-187.

179. Dik-Lung Ma, Chi-Ming Che, Fung-Ming Siu, MenGsu Yang, Kwok-Yin Wong. DNA binding and cytotoxicity of ruthenium(II) and rhenium(I) complexes of 2-amino-4-phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine. *Inorg Chem* 2007;46(3):740-749.
180. Huang HL, Li ZZ, Liang ZH, Yao JH, Liu YJ. Synthesis, cellular uptake, apoptosis, cytotoxicity, cell cycle arrest, interaction with DNA and antioxidant activity of ruthenium(II) complexes. *Eur J Med Chem*. 2011;46(8):3282-3290.
181. Tan S, Peng X, Peng W, Zhao Y, Wei Y. Enhancement of oxaliplatin-induced cell apoptosis and tumor suppression by 3-methyladenine in colon cancer. *Oncol Lett*. 2015;9(5):2056-2062.
182. Lu X, Wei H, Zhang X, Zheng W, Chang C, Gu J. Rapamycin synergizes with low-dose oxaliplatin in the HCT116 colon cancer cell line by inducing enhanced apoptosis. *Oncol Lett*. 2011;2(4):643-647.
183. Thota S, Rodrigues DA, Crans DC, Barreiro EJ. Ru (II) compounds: next-generation anticancer metallotherapeutics?. *J Med Chem*. 2018;61(14):5805-5821.
184. Zheng K, Wu Q, Wang C, Tan W, Mei W. Ruthenium(II) Complexes as Potential Apoptosis Inducers in Chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(1):29-39.
185. Flocke LS, Trondl R, Jakupec MA, Keppler BK. Molecular mode of action of NKP-1339 - a clinically investigated ruthenium-based drug - involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines. *Invest New Drugs*. 2016;34(3):261-268.
186. Qian C, Wang JQ, Song CL, Wang LL, Ji LN, Chao H. The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes. *Metallomics*. 2013;5(7):844-854.
187. Rühle A, Huber PE, Saffrich R, Lopez Perez R, Nicolay NH. The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity. *Int J Cancer*. 2018;143(11):2628-2639.
188. Bartosh TJ, Ullah M, Zeitouni S, Beaver J, Prockop DJ. Cancer Cells Enter Dormancy after Cannibalizing Mesenchymal Stem/stromal Cells (MSCs). *Proc Natl Acad Sci USA* 2016, 113, E6447–E6456.
189. Hong IS, Lee HY, Kang KS. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Friends or Enemies? *Mutat Res*. 2014;768:98–106.
190. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007;449(7162):557-563.
191. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*. 2009;259(2):150-156.
192. Pendleton C, Li Q, Chesler DA, Yuan K, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PLoS One*. 2013;8(3):e58198.
193. Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*. 2010;19(10):1449-1470.
194. Jansen BJ, Gilissen C, Roelofs H, et al. Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):481-490.
195. Kidd S, Spaeth E, Watson K, et al. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*. 2012;7(2):e30563.
196. Nicolay NH, Lopez Perez R, Rühle A, Trinh T, Sisombath S, Weber KJ, Ho AD, Debus J, Saffrich R, Huber PE. Mesenchymal stem cells maintain their defining stem cell characteristics after treatment with cisplatin. *Sci Rep*. 2016;6:20035.

197. Prendergast ÁM, Cruet-Hennequart S, Shaw G, Barry FP, Carty MP. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation. *Cell Cycle*. 2011;10(21):3768-3777.
198. Reagan MR, Kaplan DL. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Tumor-Homing: Detection Methods in Disease Model Systems. *Stem Cells*. 2011;29:920-927.
199. Chang AI, Schwertschkow AH, Nolta JA, Wu J. Involvement of Mesenchymal Stem Cells in Cancer Progression and Metastases. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2015;15:88–98.
200. Bai J, Li Y, Zhang G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biol Med*. 2017;14(4):348-362.
201. DiPaola RS. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. *Clin Cancer Res*. 2002;8(11):3311-3314.
202. Ohtsuka S, Dalton S. The biology of embryonic pluripotency. *Gene Ther*. 2008;15:74–81.
203. Lopez Perez R, Münz F, Vidoni D, et al. Mesenchymal stem cells preserve their stem cell traits after exposure to antimetabolite chemotherapy. *Stem Cell Res*. 2019;40:101536.
204. Dabiri Y, Schmid A, Theobald J, Blagojevic B, Streciwilk W, Ott I, et al. A Ruthenium(II) N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complex with Naphthalimide Ligand Triggers Apoptosis in Colorectal Cancer Cells via Activating the ROS-p38 MAPK Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3964.
205. Lima AP, Pereira FC, Almeida MA, et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *PloS One*. 2014;9(10):e105865.
206. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res*. 2001;61(3):1029-1037.
207. Achille V, Mantelli M, Arrigo G, Novara F, Avanzini MA, Bernardo ME, Zuffardi O, Barosi G, Zecca M, Maccario R. Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *J Cell Biochem*. 2011;112(7):1817-1821.
208. Damia G, D’Incalci M. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents - What are the optimal preclinical models? *Eur J Cancer*. 2009;45:2768–2781.
209. Lorusso G, Ruegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol*. 2008;130:1091–1103.
210. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol*. 2014;87:150–161.
211. Pangen R, Choi SW, Jeon OC, Byun Y, Park JW. Multiple nanoemulsion system for an oral combinational delivery of oxaliplatin and 5-fluorouracil: preparation and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2016;30;11:6379-6399.
212. Baliza IRS, Silva SLR, Santos LS, Neto JHA, Dias RB, Sales CBS, Rocha CAG, Soares MBP, Batista AA, Bezerra DP. Ruthenium Complexes With Piplartine Cause Apoptosis Through MAPK Signaling by a p53-Dependent Pathway in Human Colon Carcinoma Cells and Inhibit Tumor Development in a Xenograft Model. *Front Oncol*. 2019;9:582.

213. Tamasi G, Merlino A, Scaletti F, Heffeter P, Legin AA, Jakupec MA, Berger W, Messori L, Keppler BK, Cini R. {Ru(CO)_x}-Core complexes with benzimidazole ligands: synthesis, X-ray structure and evaluation of anticancer activity in vivo. *Dalton Trans.* 2017;46(9):3025-3040.
214. Kubincová P, Novák J, Sovadinová I. Acute Systemic Toxicity: Alternative in Vivo and in Vitro Methods. *Chemicke Listy.* 2016;110:118-126.
215. Wang J, Zhao Z, Zhou S, Zhang X, Bo H. The antitumor effect and toxicity of a ruthenium(II) complex in vivo. *Inorganic Chemistry Communications.* 2018;87:49–52.
216. Magnarin M, Bergamo A, Carotenuto ME, Zorzet S, Sava G. Increase of tumour infiltrating lymphocytes in mice treated with antimetastatic doses of NAMI-A. *Anticancer Res.* 2000;20:2939-2944.
217. Morris-Stiff G, Tan YM, Vauthey JN. Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(6):609-614.
218. Bano N, Ikram R. Histopathological and biochemical assessment of kidney damage in albino wistar rats treated with cytotoxic platinum compounds in combination with 5-FU. *Pak J Pharm Sci.* 2017;30(5):1595-1601.
219. Pinzani V, Bressolle F, Haug IJ, Galtier M, Blayac JP, Balmès P. Cisplatin-induced renal toxicity and toxicity-modulating strategies: a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;35(1):1-9.
220. Keppler BK, Berger MR, Heim ME. New tumor-inhibiting metal complexes. *Cancer Treat Rev.* 1990;17:261-277.
221. Sutcu R, Altuntas I, Yildirim B, Karahan N, Demirin H, Delibas N. *Cell Biol Toxicol.* 2006;22:221-227.
222. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury - <https://livertox.nlm.nih.gov/Oxaliplatin.htm> Посећено дана: 15.10.2020.
223. Hu Y, Yu T, Liu X, He Y, Deng L, Guo J, Hua Y, Luo T, Gao X. Improved anti-tumor efficacy via combination of oxaliplatin and fibrin glue in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;20;9(2):2515-2526.
224. Eöry ML, Zanuzzi CN, Fuentealba NA, Sguazza GH, Gimeno EJ, Galosi CM, Barbeito CG. Effects of different anesthetics in the murine model of EHV-1 infection. *Vet Pathol.* 2013;50(5):849-856.
225. Meng X, Leyva ML, Jenny M, et al. A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum stress gene CHOP. *Cancer Res.* 2009;69(13):5458-5466.
226. Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain.* 2011;12(2):222-227.
227. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(1):24-37.
228. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1137-1146.
229. Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1417(1):104-115.
230. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):836-848.
231. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer?. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):413-425.
232. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 8(Suppl 8):viii6-viii9.

233. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
234. Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(9):813-825.
235. van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA. Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity [published correction appears in *J Immunol*. 2004;173(1):695]. *J Immunol*. 2003;171(11):5842-5852.
236. Chen M, May BH, Zhou IW, Sze DM, Xue CC, Zhang AL. Oxaliplatin-based chemotherapy combined with traditional medicines for neutropenia in colorectal cancer: A meta-analysis of the contributions of specific plants. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;105:18-34.
237. Laurichesse M, Pedrono M, Guilleray G, Gallienne L, Cherel M, Schmitt F, Renac V, Bertrand G. Oxaliplatin and Methylprednisolone-induced Thrombocytopenia and Monocytopenia, Owing to Anti-GPIIb/IIIa and -CD36 Antibodies in a Patient With Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2020:S1533-0028(20)30092-X.
238. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol: CB*. 2014;24:R453-R462.
239. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 2012;5:9-19.
240. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
241. Castro JP, Grune T, Speckmann B. The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. *Biol. Chem*. 2016;397:709–724.
242. Mohanraj M, Ayyannan G, Raja G, Jayabalakrishnan C. Synthesis, spectral characterization, DNA interaction, radical scavenging and cytotoxicity studies of ruthenium(II) hydrazone complexes, *J Photochem Photobiol B*. 2016;158,164–173.
243. Skrzycki M, Majewska M, Podsiad M, Czeczot H. Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta Biochim Pol*. 2009;56(4):663-670.
244. Sharma AR, Gangrade DM, Bakshi SD, John JS. Ruthenium complexes: potential candidate for anti-tumour activity. *Int J Chem Tech Res*. 2014;6:828-837.
245. Harris AL. Hypoxia? A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:38–47.
246. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676.
247. Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. *Exp Neurol*. 2011;232:154e161.
248. Satomi A, Murakami S, Hashimoto T et al. Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue: Correlation with malignant intensity. *J Gastroenterol*. 1995;30:177–182.
249. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in Enzymology*, Academic Press. 1984;105:457-464.
250. Kocot J, Kielczykowska M, Dąbrowski W, et al. Total antioxidant status value and superoxide dismutase activity in human colorectal cancer tissue depending on the stage of the disease: a pilot study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*. 2013;22(3):431-437.

251. Zalewska-Ziob M, Adamek B, Kasperczyk J, et al. Activity of Antioxidant Enzymes in the Tumor and Adjacent Noncancerous Tissues of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:2901840.
252. Kanbagli O, Balkan J, Aykac, Toker G, et al. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1482e1484
253. Elsayed SA, Harrypersad S, Sahyon HA, El-Magd MA, Walsby CJ. Ruthenium(II)/(III) DMSO-Based Complexes of 2-Aminophenyl Benzimidazole with In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. *Molecules*. 2020;25(18):4284
254. Ferchichi S, Trabelsi H, Azzouz I, Hanini A, Rejeb A, Tebourbi O, Sakly M, Abdelmelek H. Evaluation of oxidative response and tissular damage in rat lungs exposed to silica-coated gold nanoparticles under static magnetic fields. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2711-2719.
255. Ciftci O, Ozdemir I, Cakir O, Demir S. The determination of oxidative damage in heart tissue of rats caused by ruthenium(II) and gold(I) N-heterocyclic carbene complexes. *Toxicology and Industrial Health*. 2011;27(8):735-741.
256. Mihajlovic K, Milosavljevic I, Jeremic J, Savic M, Sretenovic J, Srejevic I, Zivkovic V, Jovicic N, Paunovic M, Bolevich S, Jakovljevic V, Novokmet S. Redox and apoptotic potential of novel ruthenium complexes in rat blood and heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021;99(2):207-217.

8. СКРАЋЕНИЦЕ

8. СКРАЋЕНИЦЕ

АЛТ - аланин аминотрансферазе
АСТ - аспартат аминотрансферазе
А549 - хумана ћелијска линија карцинома плућа
АТР - аденозин трифосфат
САТ - каталаза
CDK - циклин-зависна киназа
CDKI - инхибитор циклин-зависне киназе
CO₂ - угљен-диоксид
СТ26 - ћелије карцинома колона изолизоване из BALB/c мишева
Ctr1 - транспортер бабра
dach - 1,2-диаминоциклохексан
DC - дендритске ћелије
DMEM - Дулбеков модификовани медијум
DTNB - 5,5-дитиобис-2-нитробензоева киселина
ДНК - дезоксирибонуклеинској киселини
EDTA - етилендиамин тетрасирћетна киселина
ep - етилендиамин
ЕЦМ - екстрацелуларни матрикс
FBS - фетални телећи серум
GPx - глутатион пероксидаза
GR - глутатион редуктаза
GSSG - глутатион дисулфид
GST - глутатион S-трансфераза
H₂O₂ - водоник пероксид
HCT116 - ћелије хуманог епителног колоректалног карцинома
HeLa - хумана ћелијска линија карцинома грлића материце
HNE - 4-хидроксиноненал
hTrxR - хумана тиоредоксин редуктаза
IC₅₀ - половина максималне инхибиторне концентрације
IFN-γ - интерферона-гама
IL - интерлеукин
im - имидазол
ind - индазола
KP1019 - [Hind]trans-[RuCl₄(ind)₂]
KP1339 - [Na(trans-RuCl₄(ind)₂)]
KP418 - (imH)[trans-RuCl₄(im)₂]
LDH - лактат дехидрогеназа
LOOH - липидни хидропероксиди
MDA - малондиалдехид
MRC-5 - хумани фибробласти плућа
MSCs - мезенхималне матичне ћелије
МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
NADPH - никотинамид аденин-динуклеотид-фосфата
NAMI - Na[trans-RuCl₄(im)(dmsO-S)]
NAMI-A - [Him]trans-[RuCl₄(im)(dmsO-S)]
NO• - азот моноксид радикал
OCT2 - органски катјонски транспортер у бубрезима
OH⁻ - хидроксил ањон
OH• - хидроксил радикал

$^1\text{O}_2^-$ - синглетни кисеоник
PBS - фосфатни пуфер
PI - пропиридијум јодид
pta - 1,3,5-триаза-7-фосфоадаммантан лиганд
RAPTA-C - $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{pta})]$
Rb - ретинобластома протеин
ROS - реактивне врсте кисеоника
rpm - обртаја у минути
Ru-1 - $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}][\text{Cl}]$
Ru-2 - $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}][\text{Cl}]$
SCID - тешка комбинована имунодефицијенција
SOD - супероксид дисмутаза
SW480 - ћелије хуманог епителног примарног колоректалног аденокарцинома
TBARS - реактивне супстанце тиобарбитурне киселине (производи липидне пероксидације)
TGF- β - трансформишући фактор раста бета
TLR - *Toll-Like* рецептор
TNFR - рецептор фактора некрозе тумора
TNF- α - фактор некрозе тумора алфа
Торо - топоизомераза
tpy - терпирин
VEGF - васкуларним ендотелним фактором раста

БИОГРАФИЈА

Маја Савић (рођено Јовановић), рођена је 01. априла 1989. године у Аранђеловцу. Основно образовање је започела у свом завичају у Основној школи “Живко Томић” у селу Блазнава, године 1996. и исту завршила 2004. године у селу Доња Шаторња, као ђак генерације и носилац дипломе “Вук С. Караџић”. Даље школовање у периоду од 2004.-2008. године је наставила у Београду, где је завршила Средњу медицинску школу у Општини Звездара, чиме је стекла звање - фармацеутски техничар. Након завршетка средње школе, 2008. године, уписала је Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, смер Интегрисане академске студије фармације и на истом дипломирала 15. јула 2013. године, са просечном оценом 9,10 и тиме стекла звање - магистар фармације. Током студија је користила студентску стипендију коју додељује Министарство просвете, науке и технолошког развоја и одликована је Похвалом Факултета медицинских наука за постигнуте изузетне успехе. Након дипломирања, исте године, 2013. је уписала Докторске академске студије, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит на изборном подручју Матичне ћелије у биомедицинским наукама, положила је 17. октобра 2016. године са оценом 9. Стручни испит за магистра фармације је положила пред комисијом Министарства здравља, 27. јуна 2019. године. Специјализацију из Токсиколошке хемије уписала је 2021. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Од 2013. године се бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Института Факултета медицинских наука и стални је члан истраживачке групе која се бави бројним научним пројектима у оквиру ове лабораторије. Ангажована је као коистраживач на јуниор пројектима Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Аутор је радова публикованих у међународним часописима и учесник је на међународним конгресима.

Од 05. маја 2014. године је запослена на Факултету медицинских наука као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија. Одлуком Наставно - научног већа, број: 01-1686/10-1-3 од 24.02.2021. године, поново је изабрана за асистента за ужу научну област Фармацеутска биотехнологија.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Savic M**, Arsenijevic A, Milovanovic J, Stojanovic B, Stankovic V, Rilak A, Arsenijevic N, Milovanovic M. Antitumor activity of ruthenium(II) terpyridine complexes towards colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Molecules*. 2020;25(20):4699. (M22)
2. Mihajlovic K, Milosavljevic I, Jeremic J, **Savic M**, Sretenovic J, Srejovic IM, Zivkovic VI, Jovicic N, Paunovic M, Bolevich S, Jakovljevic V, Novokmet S. Redox and apoptotic potential of novel ruthenium complexes in the rat blood and heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 2020;25:1-11. (M23)
3. Jakovljevic B, Nikolic Turnic T, Jeremic N, **Savic M**, Jeremic J, Srejovic I, Belic B, Ponorac N, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training regimes on cardiodynamic parameters in isolated heart of normotensive and hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019;97(7):631-637. (M23)
4. Milan M. Milutinović, Petar P. Čanović, Dragana Stevanović, Romana Masnikosa, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Milan M. Zarić, Bojana Simović Marković, Maja Misirkić Marjanović, Ljubica Vučićević, **Maja Savić**, Vladimir Jakovljević, Vladimir Trajković, Vladislav Volarević, Tatjana Kanjevac, and Ana Rilak Simović. Newly Synthesized Heteronuclear Ruthenium(II)/Ferrocene Complexes Suppress the Growth of Mammary Carcinoma in 4T1-Treated BALB/c Mice by Promoting Activation of Antitumor Immunity. *Organometallics*. 2018,37(22):4250-4266. (M21)
5. Plecevic S, Jakovljevic B, **Savic M**, Zivkovic V, Nikolic T, Jeremic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Tasic N, Djuric D, Jakovljevic V. Comparison of short-term and medium-term swimming training on cardiodynamics and coronary flow in high salt-induced hypertensive and normotensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2018;447(1-2):33-45. (M23)
6. Mirjana Veselinovic, Dragan Vasiljevic, Vesna Vucic, Aleksandra Arsic, Snjezana Petrovic, Aleksandra Tomic-Lucic, **Maja Savic**, Sandra Zivanovic, Vladislava Stojic, Vladimir Jakovljevic. Clinical benefits of n-3 PUFA and γ -linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients*. 2017;9(4):325. (M21)
7. Novokmet S, Stojic I, Radonjic K, **Savic M**, Jeremic J. Toxic effects of metallopharmaceuticals. *Ser J Exp Clin Res*. 2017;18(3):191-4. (M51)
8. Vasiljevic D, Veselinovic M, **Jovanovic M**, Jeremic N, Arsic A, Vucic V, Lucic-Tomic A, Zivanovic S, Djuric D, Jakovljevic V. Evaluation of the effects of different supplementation on oxidative status in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2016;35(8):1909-15. (M23)
9. Jevdjevic M, **Jovanovic M**, Jeremic N, Cankovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Djuric D, Jakovljevic V. Acute effects of nandrolone decanoate on oxidative stress in isolated rat heart. *Arch of Biol Sci*. 2015;67(1):331-7. (M23)
10. Stojanovic Tomic J, Jakovljevic Vj, Zivkovic V, Srejovic I, Valdevit Z, Radovanovic D, Djuric D, Ahmetovic Z, Peric D, Cankovic M, **Jovanovic M**, Djordjevic D. Biphasic response of cardiodynamic adaptations to swimming exercise in rats. *Gen Physiol Biophys*. 2015;34(3):301-10. (M23)
11. **Jovanovic M**. Behaviours and attitudes about body image and eating disorders among adolescent females in Kragujevac. *Ser J Exp Clin Res*. 2015;16(3):235-9. (M51)

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маја Савић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 2022 године,

Маја Савић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маја Савић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у КРАГУЈЕВЦУ, _____, 2022 године,

Maја Selent

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Маја Савић

Број индекса: 110/2013

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Антитуморски ефекти комплекса Рутенијума II у експерименталним моделима колоректалног карцинома *in vitro* и *in vivo*“

Ментор: Проф. др Слободан Новокмет

Потписана МАЈА САВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу**.

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

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

Потпис аутора

У Крагујевцу, _____

Maја Савић